

211.3494.3

Université de Montréal

**Caractérisation moléculaire d'un nouveau syndrome de prédisposition au
cancer colorectal**

par
Karine Jacob

Département de pathologie et biologie cellulaire
Faculté des études supérieures

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Maître en science (M.Sc)
en pathologie et biologie cellulaire
option cancérologie

Août 2006
© Karine Jacob, 2006



AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :
**Caractérisation moléculaire d'un nouveau syndrome de prédisposition au
cancer colorectal**

présenté par :
Karine Jacob

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Daniel Sinnett
président-rapporteur

Dr Jean-Christophe Fournet
directeur de recherche

Dr Benoît Panzini
membre du jury

SOMMAIRE

Au CHU Sainte-Justine, nous avons observé deux patients non apparentés présentant une association d'adénomatose colorectale et de pilomatricomatose. Nous avons émis l'hypothèse que cette association pouvait être causée par une altération génétique de la voie de Wnt ou des systèmes de réparation de l'ADN. Récemment, une telle association a été rapportée par Baglioni *et al.*, en relation avec une mutation dans le gène de MYH appartenant au système de réparation des bases par l'excision (BER). Nous avons démontré que l'association de ces deux pathologies, chez nos deux patients, n'était pas causée par une mutation constitutionnelle dans les gènes candidats de la voie de Wnt : APC, β -catenin et AXIN2 et dans les trois principaux gènes du système BER : MYH, OGG1 and MTH1. Les études immunohistochimiques ont démontré une surexpression de β -catenin, évoquant une dérégulation de la voie de Wnt, ceci dans les deux tumeurs. Nous avons aussi détecté une instabilité des microsatellites (MSI) dans un adénome colique provenant d'un seul de nos deux patients. Ce syndrome d'adénomatose colorectale et de pilomatricomatose (CAP) représente l'expression phénotypique de deux anomalies génétiques, une mutation ayant été trouvée chez l'un de nos patients dans le système MMR, alors qu'une mutation au sein du système BER a précédemment été rapportée par un autre groupe de recherche (Baglioni *et al.*). Nous avons donc démontré que ce syndrome est génétiquement hétérogène. Aucune anomalie n'a été détectée chez notre second patient, suggérant qu'une mutation dans un autre gène de ces systèmes pourrait également être à l'origine de ce syndrome.

Mots-clés : adénomatose colorectale, pilomatricomatose, syndrome de prédisposition au cancer colorectal, hétérogénéité génétique

SUMMARY

We observed at CHU Sainte-Justine, two unrelated patients who showed an association of colorectal adenomatosis and pilomatricomatosis. We made the hypothesis that this association was due to a genetic alteration in the Wnt signaling pathway or in DNA reparation systems. Recently, Baglioni *et al.* reported such an association in a kindred harboring a mutation in MYH gene, an enzyme of the base excision repair pathway (BER). We first demonstrated that this association was not due to germline mutations in genes involved in the Wnt signaling pathway: APC, β -catenin and AXIN2. Moreover, no constitutional mutation was detected in enzymes of the BER system: MYH, OGG1 and MTH1. Immunohistochemical studies using a β -catenin antibody demonstrated a deregulation of the Wnt signaling pathway. Microsatellite instability (MSI) was detected in the colorectal adenoma of one of our patients. MSI is a marker of a mutation in a gene involved in the mismatch repair system (MMR). This colorectal adenomatosis and pilomatricomatosis (CAP) syndrome is the phenotypic expression of two genetic anomalies: one was previously identified in the BER system (MYH) and we identified the other mutation in the MMR system. We concluded that the CAP syndrome shows genetic heterogeneity. No mutation was identified in the other patient suggesting that another anomaly in these reparation systems would cause the CAP syndrome.

Key words: colorectal adenomatosis, pilomatricomatosis, colorectal tumor predisposition syndrome, genetic heterogeneity

TABLE DES MATIÈRES

PAGE TITRE	I
IDENTIFICATION DU JURY	II
SOMMAIRE	III
SUMMARY.....	IV
TABLE DES MATIÈRES	V
LISTE DES TABLEAUX	VII
LISTE DES FIGURES.....	VIII
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS.....	X
REMERCIEMENTS.....	XIII
CHAPITRE I: INTRODUCTION.....	1
1. TUMORIGENÈSE COLORECTALE	1
2. SYNDROMES DE PRÉDISPOSITION AU CANCER COLORECTAL	5
2.1 POLYPOSE ADÉNOMATEUSE FAMILIALE (FAP)	6
2.1a) <i>La voie de signalisation de Wnt</i>	12
2.1b) <i>Le complexe multiprotéique de β-catenin /APC/AXIN1/2/GSK3-β</i>	15
2.1c) <i>Altération de la voie de Wnt dans les tumeurs solides</i>	18
2.2 CANCER COLORECTAL HÉRÉDITAIRE SANS POLYPOSE (HNPCC OU SYNDROME DE LYNCH)	21
2.3 POLYPOSE ASSOCIÉE À MYH (MAP)	28
2.3a) <i>Le système de réparation des bases par l'excision</i>	30

2.3b) Altération des enzymes du système BER dans le cancer.....	34
3. PILOMATRIXOME	35
CHAPITRE II : HYPOTHÈSE ET ÉTAPES DU TRAVAIL	37
CHAPITRE III : OBJECTIFS DU PROJET	39
CHAPITRE IV : ARTICLE 1	40
CHAPITRE V : ARTICLE 2	60
CHAPITRE VI : DISCUSSION.....	85
1. VERS UNE NOUVELLE ENTITÉ CLINIQUE	85
2. DÉRÉGULATION DE LA VOIE DE WNT, SANS IDENTIFICATION D'ALTÉRATION GÉNÉTIQUE	87
3. HÉTÉROGÉNÉITÉ DU SYNDROME CAP	91
3.a) Mutation dans MYH.....	91
3.b) Défaillance dans le système de réparation des mésappariements de l'ADN	92
3.c) Autres anomalies	93
4. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES FUTURES	94
RÉFÉRENCES	96
ANNEXE I.....	XIV
ANNEXE II	XX
ANNEXE III	XXII
ANNEXE IV.....	XXIV

LISTE DES TABLEAUX

	<u>Page</u>
 <u>INTRODUCTION</u>	
Tableau I : Exemples de gènes suppresseurs de tumeurs localisés par perte d'hétérozygotie	2
 <u>ANNEXE I</u>	
Tableau II : Amorces β -catenin et AXIN2	xiv
Tableau III : Amorces du gène MYH	xv
Tableau IV: Amorces du gène hOGG1	xvii
Tableau V: Amorces du gène hMTH	xviii
Tableau VI: Conditions de PCR	xix
Tableau VII: Protocole d'amplification de l'ADN génomique	xix
 <u>ANNEXE III</u>	
Tableau VIII : Conditions de PCR pour la microdissection dans un volume total de 25 μ L	xxiii
Tableau IX: Protocole pour l'amplification de l'ADN provenant des cellules microdissequées	xxiii

LISTE DES FIGURES

	<u>Page</u>
<u>INTRODUCTION</u>	
Figure 1 :	Cryptes épithéliales présentes dans un intestin normal 2
Figure 2:	Carcinogenèse multiséquentielle du cancer colorectal 5
Figure 3:	Polypose adénomateuse familiale 7
Figure 4 :	Exemple d'une perte d'hétérozygotie 9
Figure 5:	Exemple d'une perte d'allèle sur un gel de polyacrylamide 10
Figure 6:	Corrélations génotype-phénotype dans le gène de APC 11
Figure 7:	Voie de signalisation de Wnt 14
Figure 8:	Structure du gène β -catenin (CTNNB1) 16
Figure 9:	Structure du gène APC 17
Figure 10:	Structure du gène AXIN1/2 18
Figure 11:	Protéines impliquées dans le système de réparation des mésappariements de l'ADN 22
Figure 12:	Système de réparation des mésappariements de l'ADN 24
Figure 13:	Détection d'une instabilité des microsatellites 27
Figure 14:	Liste des mutations pathogéniques affectant le gène de MYH 29
Figure 15:	Structure de 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine 31
Figure 16:	Rôles de MutM, MutY et MutT 32
Figure 17:	Étapes du système de réparation des bases par l'excision 33
Figure 18:	Présentation clinique et image macroscopique d'un pilomatixome 36

ARTICLE 1 :

Figure 1:	Macroscopic and microscopic view of an adenoma	52
Figure 2:	Microscopic view of a pilomatricoma	53

ARTICLE 2 :

Figure 1:	Immunohistochemistry using β -catenin antibody	76
Figure 2:	Microsatellite instability studies	78
Figure 3:	Microdissection of colorectal adenomas	78

ANNEXE III :

Figure 19:	Microdissection au laser des adénomes colorectaux chez les patients I et II.	xxii
------------	--	------

ANNEXE IV :

Figure 20 :	Arbre généalogique de la famille du patient I	xxiv
Figure 21 :	Arbre généalogique de la famille du patient II	xxv

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

%:	pourcent
α :	alpha
β :	béta
μ :	micro
g:	gramme
L:	litre
mol :	mole
A :	adénine
ACF:	foyer de cryptes aberrantes (aberrant crypt foci)
ADN:	acide désoxyribonucléique
AFAP:	polypose adénomateuse familiale atténuée (attenuated familial adenomatosis polyposis)
AP:	sites abasiques
APC:	adenomatous polyposis coli
ATP:	adénosine triphosphate
BER:	système de réparation de bases par l'excision (base excision repair system)
C:	cytosine
CAP:	colorectal adenomatosis and pilomatricomatosis syndrome
CCR:	cancer colorectal
CDH1:	E-cadherin
CK1:	casein-kinase 1

DKK:	Dickkopf
Dsh:	Dishevelled
drp:	5'-deoxyribose phosphate
FAP:	polypose adénomateuse familiale (familial adenomatosis polyposis)
FZ:	Frizzled
G:	guanine
GSK3- β :	glycogen synthase kinase 3-beta
HNPCC:	cancer colorectal héréditaire sans polypose (hereditary non polyposis colorectal cancer)
ITF-2:	immunoglobulin transcription factor
kb:	kilobase
kDa:	kilodalton
LCM:	laser capture microdissection
LEF:	lymphoid enhancing factors
LOH:	perte d'hétérozygotie (loss of heterozygosity)
LRP5/6:	LDL receptor related protein 5 et 6
MAP:	polypose associée à MYH (MYH associated polyposis)
MCR:	site de haute fréquence mutationnelle (mutation cluster region)
MMP-7:	matrix-métalloprotéinase-7
MMR:	système de réparation des mésappariements de l'ADN (DNA mismatch repair system)
MLH1:	MutL homologs

MSH2/3/6:	MutS homologs
MSI:	instabilité des microsatellites (microsatellite instability)
pb:	paire de base
PCNA:	proliferating-cell nuclear antigen
PCR :	polymerase chain reaction
Pol:	polymérase
PP2A:	protéine phosphatase 2A
ROS:	radicaux libres (reactive oxygen species)
sFRP:	sFrizzled related protein
SAMP:	motifs Serine-Alanine-Methionine-Proline
Ser:	Sérine
T:	Thymine
TCF:	T cell factors
Wnt:	wingless type
8-OHdG:	8-hydroxydeoxyguanosine
8-oxo-G:	8-hydroxydeoxyguanosine

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je tiens à remercier et à exprimer toute ma gratitude à mon directeur de recherche, Dr Jean-Christophe Fournet, pour m'avoir transmis sa passion pour la recherche sur la génétique du cancer.

Je souhaite également remercier Dr. Daniel Sinnett pour m'avoir adoptée dans son laboratoire, pour m'avoir encadrée et fait bénéficier de ses conseils dans la réalisation de mon projet.

Un grand merci à toute l'équipe des Dr. Daniel Sinnett et Dr. Damien Labuda pour leur générosité, leur support, leur aide et tous les bons moments qu'on a passés ensemble.

Je tiens particulièrement à remercier Dr. Dorothée Bouron-Dal Soglio, Dr. Anne-Laure Rougemont, Dr. Jacques Michaud, Dr. Luc Oligny et Dr. Julie Powell pour leurs conseils constructifs et pour leur expertise.

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à mes parents et à mes sœurs Magalie et Ariane pour leur support et leurs encouragements. Je remercie aussi David pour son soutien, sa patience et pour avoir toujours été à mes côtés quand j'avais besoin de lui.

Je remercie spécialement Eniko Papp, ma grande amie.

CHAPITRE I: INTRODUCTION

Chez l'homme, trois principaux syndromes de prédisposition au cancer colorectal ont été décrits. Il émerge de ces syndromes des phénotypes cliniques différents et beaucoup d'entre eux n'ont pas encore été caractérisés. Nous avons observé récemment au CHU Sainte-Justine deux patients non apparentés présentant une association de pilomatricomatose et d'adénomatose colorectale. Le pilomatrixome est une tumeur bénigne de la peau et la pilomatricomatose se caractérise par la présence de plusieurs pilomatrixomes, disséminés sur tout le corps. Un adénome consiste en une prolifération de glandes intestinales dysplasiques, correspondant macroscopiquement à une excroissance développée au sein de la muqueuse du côlon et qui peut évoluer en tumeur maligne. L'adénomatose est caractérisée par l'apparition de nombreux adénomes du côlon et prédispose au cancer du côlon. Nous émettons l'hypothèse que cette association constitue une nouvelle entité clinique et que des anomalies génétiques dans des voies de signalisation spécifiques sont en cause. Ce travail a pour objectif la caractérisation moléculaire de cette association.

1. Tumorigenèse colorectale

Selon Santé Canada, le cancer colorectal occupe le troisième rang des cancers les plus fréquents au Canada, après le cancer du sein et du poumon chez la femme, et le cancer de la prostate et du poumon chez l'homme. Bien que le nombre de personnes atteintes d'un cancer colorectal diminue, environ 17 600 nouveaux cas seront diagnostiqués au Canada cette année, et environ 6 500 Canadiens mourront des suites

de ce cancer durant cette période. Dans les deux tiers des cas environ, le cancer est localisé dans le gros intestin ou côlon, le dernier tiers affectant le rectum. La majorité des cancers colorectaux sont des adénocarcinomes. En général, les taux d'incidence et de mortalité liés au cancer colorectal augmentent avec l'âge et sont plus élevés chez les hommes que chez les femmes. Le taux d'incidence du cancer colorectal varie considérablement dans le monde. Le risque de développer un cancer colorectal est jusqu'à 20 fois supérieur dans les pays développés (Europe, Amérique du Nord, Australie) que dans les pays en voie de développement (Malaisie, Corée, Afrique) (Jemal, Murray et al. 2005).

Le cancer colorectal est une tumeur maligne qui se développe à partir des cellules épithéliales tapissant les glandes (adénocarcinome) de l'intestin ou du rectum. En effet, dans le gros intestin, une couche de cellules épithéliales recouvre les glandes tubulaires qui sont aussi appelées cryptes (Figure 1).

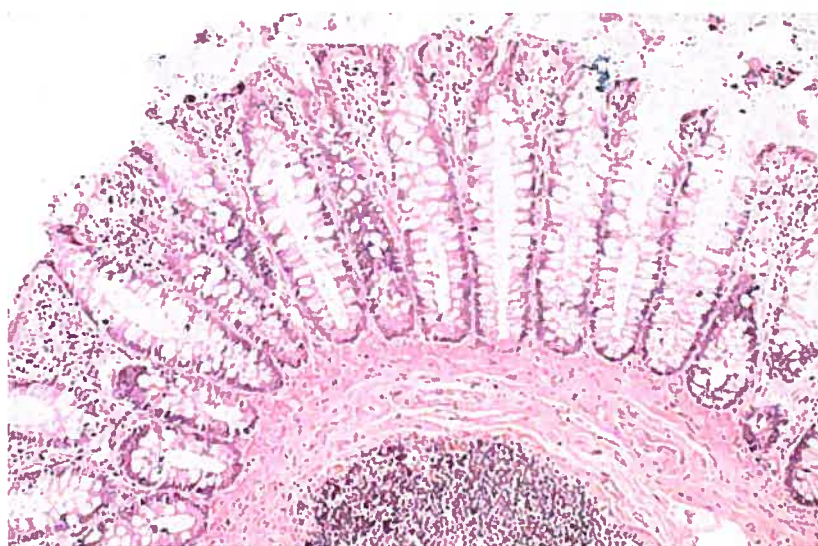


Figure 1 : *Cryptes épithéliales présentes dans un intestin normal.*

(Tiré du Département de Pathologie, CHU Sainte-Justine, Montréal.)

Les cellules souches sont localisées à la base de chaque crypte et donnent naissance à différents types de cellules. Ces nouvelles cellules migrent vers le haut de la crypte et sont exfoliées dans la lumière par un mécanisme apoptotique. Dans un intestin normal, le taux de cellules mitotiques équivaut au taux de cellules perdues. Les tumeurs intestinales sont le résultat d'une augmentation du ratio gain : perte. Ces cellules supplémentaires produites dérivent toutes de la multiplication d'un même clone, cellule initiatrice du cancer qui a acquis certaines caractéristiques lui permettant de se diviser indéfiniment (Fodde, Smits et al. 2001).

Les ACF (ACF, aberrant crypt foci) sont des lésions non visibles à l'œil nu qui nécessitent, pour leur dépistage, un microscope endoscopique et sont considérées comme un précurseur au carcinome colorectal.

La définition d'un polype est strictement macroscopique et ne préjuge pas de sa nature anatomopathologique. Un polype est une formation en relief de la muqueuse intestinale. L'analyse histologique permet de classer ces lésions en polype hyperplasique, polype hamartomateux, pseudopolype inflammatoire, et adénome.

Les adénomes sont les tumeurs polypoïdes colorectales les plus fréquentes. Il s'agit de lésions pré-cancéreuses qui peuvent être à l'origine d'un cancer colorectal. L'adénome se définit par la présence d'une dysplasie épithéliale; sa définition est par conséquent histologique. De même, un adénome peut présenter plusieurs aspects

architecturaux: tubuleux, vilieux ou tubulo-villeux. Le risque de cancérisation d'un adénome augmente avec sa taille, son pourcentage de contingent vilieux et son caractère plan (ce dernier aspect étant dû à la difficulté de détection de telles lésions). (Cheng and Lai 2003; Colucci, Yale et al. 2003; Goldstein 2006).

À cette séquence morphologique correspond une séquence génétique impliquant plusieurs gènes dont les altérations se succèdent et s'accumulent dans un ordre chronologique déterminé en utilisant différentes voies de signalisation. Le carcinome colorectal provient d'une séquence de changements histopathologiques bien caractérisés impliquant l'activation d'oncogènes spécifiques et l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs. Au moins 4 changements spécifiques doivent se produire pour assurer l'évolution de la tumeur: l'inactivation du gène APC, l'activation de KRAS, l'inactivation de SMAD2/4 et de TP53 (Figure 2). La séquence de survenue de ces altérations semble plus importante dans la progression tumorale que l'accumulation de ces changements génétiques (Kinzler and Vogelstein 1996).

La première altération génétique favorisant l'initiation clonale est une mutation biallélique dans le gène suppresseur de tumeurs APC, ce qui engendre la transformation des cryptes épithéliales en un foyer de cryptes aberrantes. Une mutation activatrice dans l'oncogène KRAS est ensuite requise pour l'expansion clonale et la croissance de l'adénome. Des mutations dans d'autres oncogènes ont été identifiées dans les adénomes qui ne présentent pas de mutation de KRAS. Des

études d'allélotypage ont permis l'identification de plusieurs gènes suppresseurs de tumeurs impliqués dans les étapes subséquentes, consistant en l'expansion clonale et de la transformation maligne de la tumeur. L'inactivation des gènes SMAD2 et SMAD4 situés dans le bras long du chromosome 18 (18q), suivie de TP53 dans la région 17p13 participent à la progression maligne (Fearon and Vogelstein 1990; Vogelstein and Kinzler 1993; Cheng and Lai 2003).

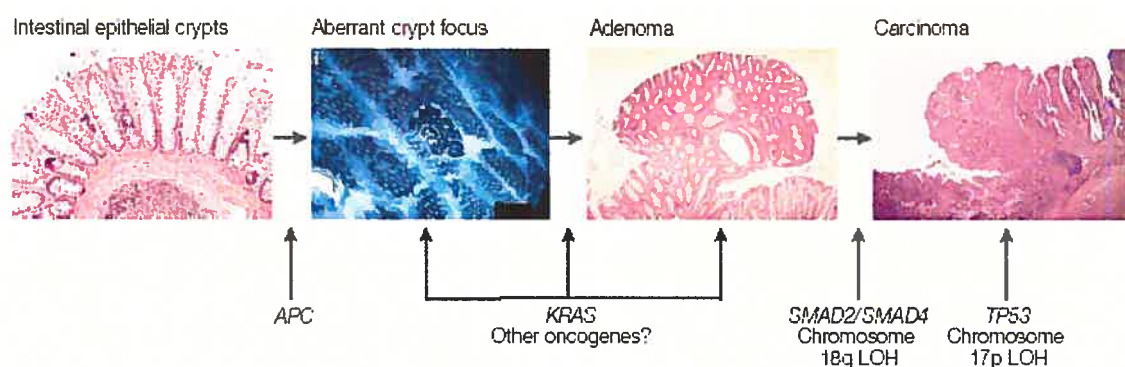


Figure 2 : *Carcinogénèse multiséquentielle du cancer colorectal. La séquence débute par un foyers de cryptes aberrantes, suivie du développement d'un adénome, puis d'un carcinome.*

(Tiré de Fodde R, Smits R, Clevers H. APC, signal transduction and genetic instability in colorectal cancer. Nat Rev Cancer 2001;1:55-67.)

2. Syndromes de prédisposition au cancer colorectal

Le cancer colorectal est traditionnellement divisé en deux formes, soit la forme sporadique et une autre, familiale. Selon l'institut national américain du cancer (NCI), environ 75% des patients atteints de cancer colorectal présentent une maladie sporadique, sans lien évident avec l'hérédité. La forme familiale représente environ

25% de tous les cancers colorectaux. Dans cette forme, les patients présentent une histoire familiale de cancer suggérant une contribution génétique. Des mutations génétiques ont été identifiées comme étant la cause du cancer familial dans environ 5-6% de tous les cas de cancer colorectaux (Weitz, Koch et al. 2005). Il existe trois principaux syndromes de prédisposition au cancer colorectal : la polypose adénomateuse familiale (FAP), le cancer colorectal héréditaire sans polypose (HNPCC ou syndrome de Lynch) et la polypose associée à MYH (MAP).

2.1 Polypose adénomateuse familiale (FAP)

La polypose adénomateuse familiale (FAP) est un syndrome de prédisposition au cancer colorectal, hérité de façon autosomique dominante. Elle se caractérise par l'émergence de centaines ou de milliers de polypes dans le côlon vers la fin de l'enfance ou de l'adolescence (Figure 3) (de la Chapelle 2004; Galiatsatos and Foulkes 2006). En l'absence de traitement, un ou plusieurs de ces adénomes vont évoluer en adénocarcinomes vers l'âge de 40 à 50 ans. Les patients atteints de FAP peuvent aussi développer des manifestations extra-coliques, à savoir des kystes cutanés et osseux, des adénomes duodénaux, des tumeurs desmoïdes et des anomalies de la rétine. La FAP est causée par des mutations troncantes dans le gène APC, situé dans la région 5q21 (Grodin, Thliveris et al. 1991; Kinzler, Nilbert et al. 1991; Nishisho, Nakamura et al. 1991). Les individus comportant une mutation germinale dans le gène APC sont à risque très élevé de développer une FAP, la pénétrance étant proche de 100% (Galiatsatos and Foulkes 2006). Suivant l'hypothèse des deux événements de Knudson, la première mutation germinale du gène APC correspond au

premier événement (Vogelstein and Kinzler 1993). Une deuxième mutation somatique est responsable de la perte de fonction du gène APC (Powell, Zilz et al. 1992; Cohen 2003). Elle peut souvent être mise en évidence par une perte d'allèles (ou perte d'hétérozygotie ou LOH).



Figure 3: *Polypose adénomateuse familiale illustrant la présence de multiples adénomes du côlon.*

(Tiré du Département de Pathologie, CHU Sainte-Justine, Montréal.)

La perte d'hétérozygotie (loss of heterozygosity LOH) correspond à une perte complète d'un allèle parental au niveau d'un locus précis dans les cellules somatiques, perte qui n'est pas présente dans les cellules normales du patient (Cavenee, Dryja et al. 1983). Une perte d'allèle peut être causée par différents mécanismes génétiques à savoir une délétion physique d'un chromosome, une nondisjonction mitotique suivie d'une réplication des chromosomes, une recombinaison mitotique ou une conversion de gène. La perte d'allèle est une forme fréquente de déséquilibre allélique et l'étude de celle-ci a particulièrement été utilisée en cancérologie pour identifier des régions génomiques qui contiennent des gènes suppresseurs de tumeurs (Tableau I) (Zheng, Peng et al. 2005).

Type tumoral	Localisation	Gène supresseur de tumeur localisé	Fonction
Rétinoblastome(Zheng, Peng et al. 2005)	13q14	RB	Facteur de transcription
Tumeur de Wilms	11p13	WT1	Facteur de transcription
Neuro-fibromatose I	17q11	NF1	Protéine GAP
Cancer colique	18q21	DCC	Adhésion inter-cellulaire
Cancer colique	5q21	APC	Transmission du signal
Cancer du rein	3p25	VHL	Adhésion inter-cellules
Tumeurs variées	17p13	P53	Facteur de transcription

Tableau I : Exemples de gènes suppresseurs de tumeurs localisés par perte d'hétérozygotie.

(Tiré du site : <http://medes3.med.umontreal.ca/medweb>)

Dans le modèle tumoral, deux mutations inactivant successivement les deux allèles d'un gène suppresseur de tumeur sont requises pour le développement de la tumeur (Figure 4) (Vogelstein and Kinzler 1993). Pour étudier une région au sein de laquelle une perte d'allèle est soupçonnée, des marqueurs génétiques qui se situent près du présumé gène suppresseur de tumeur sont utilisés. La première mutation est souvent une mutation ponctuelle ou une petite délétion qui n'affecte pas l'intégrité du génome. Par conséquent, les deux allèles du marqueur génétique sont retenus. La deuxième mutation implique de plus gros fragments d'ADN, comme une perte d'un bras de chromosome par exemple. La deuxième mutation entraîne la perte du

marqueur identifié comme A2 dans la figure 4 et situé sur le bras court du chromosome maternel. Il y a donc perte d'un allèle dans le marqueur A2.

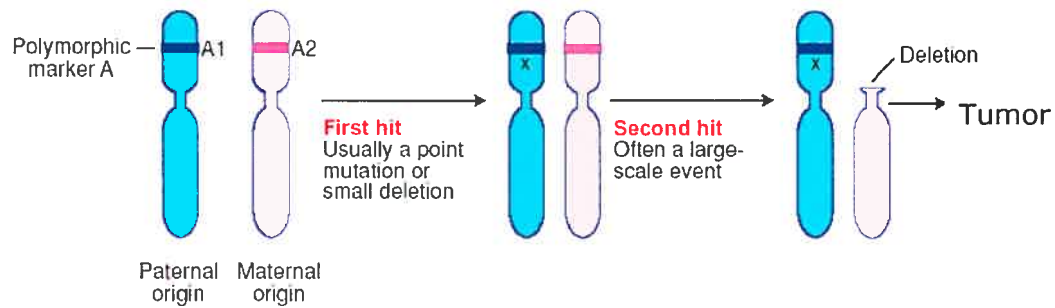


Figure 4 : Exemple d'une perte d'hétérozygotie.

(Tiré du site : www-ermm.cbcu.cam.ac.uk)

Brièvement, les marqueurs génétiques bordant la région présumée de contenir un gène suppresseur de tumeurs sont amplifiés et migrés sur gel (Figure 5). La détection d'une perte d'allèle nécessite à la fois du tissu normal et du tissu tumoral provenant du patient. Sur l'analyse de l'ADN normal (lymphocytes du sang), un marqueur polymorphe présent à l'état hétérozygote est dit informatif: le produit d'amplification de la région microsatellite par PCR contiendra deux types de fragments, de tailles différentes. Dans le cas où le marqueur considéré est présent à l'état homozygote, on dit que le marqueur n'est pas informatif : le produit d'amplification par PCR ne sera constitué que de fragments de même taille. Quand le marqueur est polymorphe, les deux allèles ont une probabilité d'être de longueur différente (hétérozygotes), ce qui permet de les différencier lors de l'analyse après amplification par PCR. L'analyse d'un marqueur informatif dans une tumeur qui a une perte de matériel génétique

englobant ce marqueur sur un des deux allèles ne montrera que des fragments de taille identique. On parlera alors de perte d'hétérozygotie. Pour l'étude d'un marqueur non informatif, la délétion d'un allèle dans la tumeur ne pourra pas être observée par cette méthode, car l'analyse des fragments après PCR ne montrera que des fragments de même taille, que le marqueur soit perdu ou non.

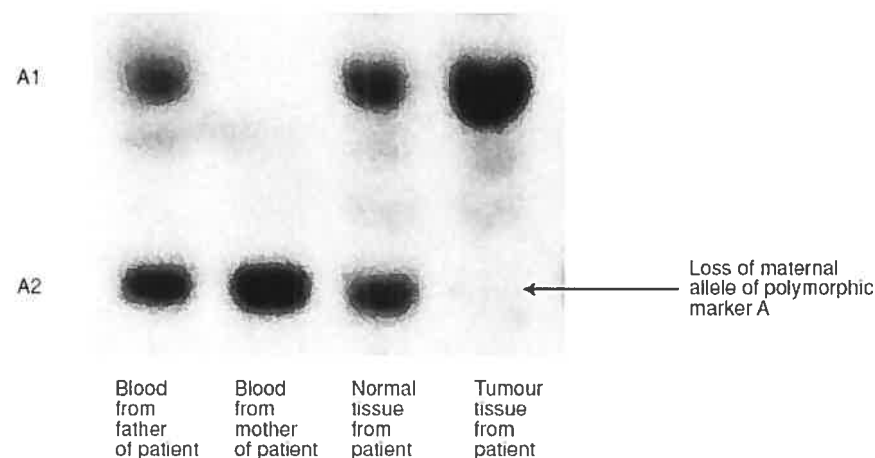


Figure 5: *Exemple d'une perte d'allèle sur un gel de polyacrylamide.*

(Tiré du site : www-ermm.cbcu.cam.ac.uk)

APC est un gène suppresseur de tumeurs. Des mutations germinales dans le gène APC sont responsables de la polypose familiale adénomateuse avec plus de 300 mutations différentes dans le gène APC rapportées à ce jour (Figure 6). La grande majorité de ces mutations sont des insertions, des délétions et des mutations non-sens, ce qui engendre des mutations "frameshifts" (décalage du cadre de lecture) et des codons stops prématurés résultant en une protéine APC tronquée. La majorité des mutations germinales est retrouvée à l'extrémité 5' du gène, qui est appelée site de

haute fréquence mutationnelle (mutation cluster region MCR). Les deux codons les plus fréquemment mutés sont en position 1061 et 1309. Plusieurs corrélations génotype-phénotype ont été décrites. Certaines mutations dans certains codons sont associées avec le développement de tumeurs extra-intestinales ou d'anomalies rétinienes ou encore avec une évolution clinique plus défavorable. Par exemple, la polypose adénomateuse familiale adénomateuse atténuée (AFAP) est caractérisée par le développement de moins de 100 adénomes et par une présentation clinique plus tardive. Elle est causée par des mutations dans les extrémités 3' et 5' du gène APC ou par une déficience dans le système d'épissage alternatif, situé au sein de l'exon 9 du gène APC (Cohen 2003).

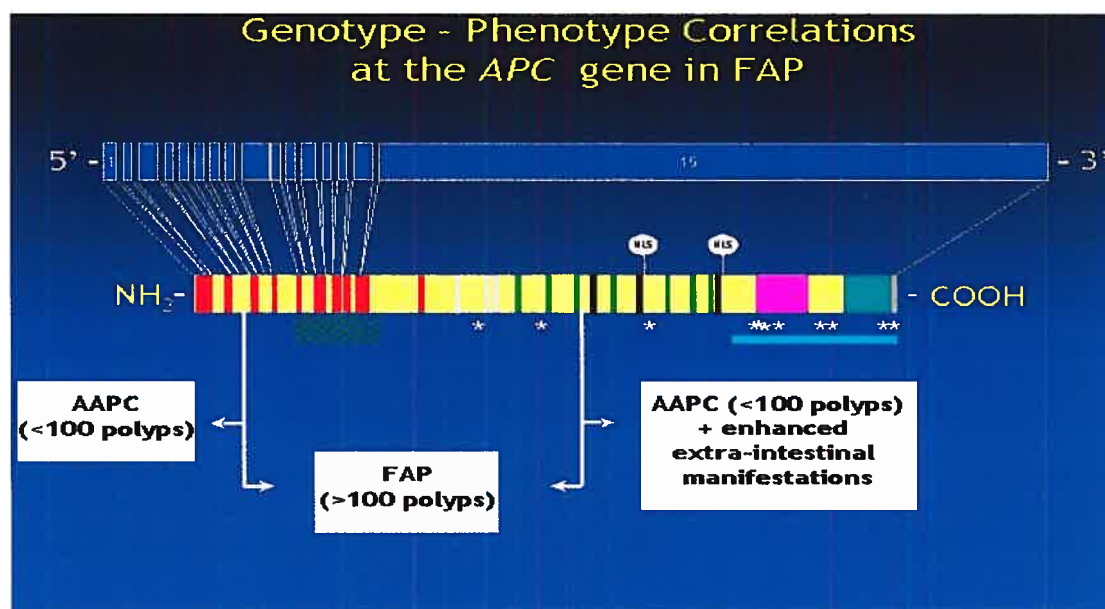


Figure 6 : *Corrélations génotype-phénotype dans le gène de APC.*

(Tiré du site : www.eurogene.org)

Le syndrome de Gardner est une variante de la polypose adénomateuse familiale qui se transmet de manière autosomique dominante. Ce syndrome est caractérisé par une polypose colorectale associée avec des tumeurs osseuses, cutanées, des tissus mous,

une hyperplasie de l'épithélium de la rétine et des anomalies dentaires (Gardner 1962). Les kystes épidermoïdes représentent la manifestation cutanée la plus commune de ce syndrome et se développent généralement avant la puberté. D'autres tumeurs, tels que les lipomes, fibromes et léiomyomes ont aussi été décrites. Ce syndrome est causé par des mutations germinales dans le gène APC, survenant typiquement entre les codons 1403 et 1578 (de la Chapelle 2004).

Environ 80% des cancers colorectaux sporadiques contiennent des mutations somatiques dans le gène APC (Lustig and Behrens 2003). Des mutations somatiques dans le gène APC ont aussi été décrites dans le carcinome mammaire, la fibromatose desmoïde, l'hépatoblastome, le carcinome hépatocellulaire, le carcinome gastrique, le médulloblastome, le carcinome ovarien, le carcinome pancréatique et le carcinome thyroïdien (Karim, Tse et al. 2004; Doucas, Garcea et al. 2005).

APC est une protéine d'échafaudage qui joue un rôle important dans la voie de signalisation de Wnt. L'activation inappropriée de la voie de Wnt est directement impliquée dans la tumorigenèse colorectale.

2.1a) La voie de signalisation de Wnt

La voie de signalisation cellulaire de Wnt est médiée par les glycoprotéines de type wingless et est très conservée entre les espèces. Cette voie de signalisation influence le développement embryonnaire, la polarité et l'adhésion cellulaires, l'apoptose et la

tumorigenèse (Karim, Tse et al. 2004). Cette voie a été initialement caractérisée chez la mouche *Drosophila melanogaster*, où elle joue un rôle dans l'embryogenèse. La voie de Wnt est résumée dans la Figure 7.

En l'absence de Wnt, β -catenin est recruté dans un complexe de destruction avec APC, glycogène synthase-3 β (GSK3- β) et AXIN1/2, ce qui facilite la phosphorylation de β -catenin par la caséine-kinase 1 (CK1) et GSK3- β . Ceci entraîne l'ubiquitination de β -catenin et la dégradation protéosomique de β -catenin. Dans le noyau, les gènes cibles sont réprimés. Dans ce cas, la cellule maintient un niveau bas de β -catenin cytoplasmique (Moon, Kohn et al. 2004).

Lorsque les glycoprotéines Wnt sont sécrétées, elles peuvent interagir avec les antagonistes sécrétés par la cellule hôte, tels que le sFrizzled related protein (sFRP) et les membres de la famille de Dickkopf (DKK), ce qui prévient l'activation de la voie de signalisation. Si la concentration locale en glycoprotéines Wnt excède la concentration d'inhibiteurs, elles interagissent avec les membres de la famille des récepteurs serpents Frizzled (FZ) et possiblement avec les co-récepteurs transmembranaires LDL receptor related protein 5 et 6 (LRP5 et LRP6). La liaison de Wnt à FZ entraîne l'activation de la protéine Dishevelled (Dsh/Dvl). L'activation et le recrutement membranaire de Dsh induit la dissociation du complexe APC/AXIN1/2/GSK3- β , par un mécanisme encore inconnu. Ensuite, Dsh recrute le complexe de destruction à la membrane plasmique, où AXIN1/2, une protéine d'échafaudage, lie directement la queue cytoplasmique de LRP5/6. AXIN1/2 est par

la suite dégradé, ce qui diminue la dégradation de β -catenin. L'activation de Dsh mène également à l'inhibition de GSK3- β , ce qui réduit la phosphorylation et la dégradation de β -catenin. En présence de protéines Wnt, la stabilité post-translationnelle de β -catenin est augmentée par la dégradation de AXIN1/2 et l'inhibition de GSK3- β . Lorsque les niveaux intracellulaires de β -catenin augmentent, cette protéine s'accumule dans le noyau et interagit avec T cell factors (TCF) et lymphoid enhancing factors (LEF) pour activer la transcription de gènes cibles tels que c-Myc, cycline D, matrix-métalloprotéinase-7 (MMP-7) et immunoglobulin transcription factor (ITF-2) (Doucas, Garcea et al. 2005).

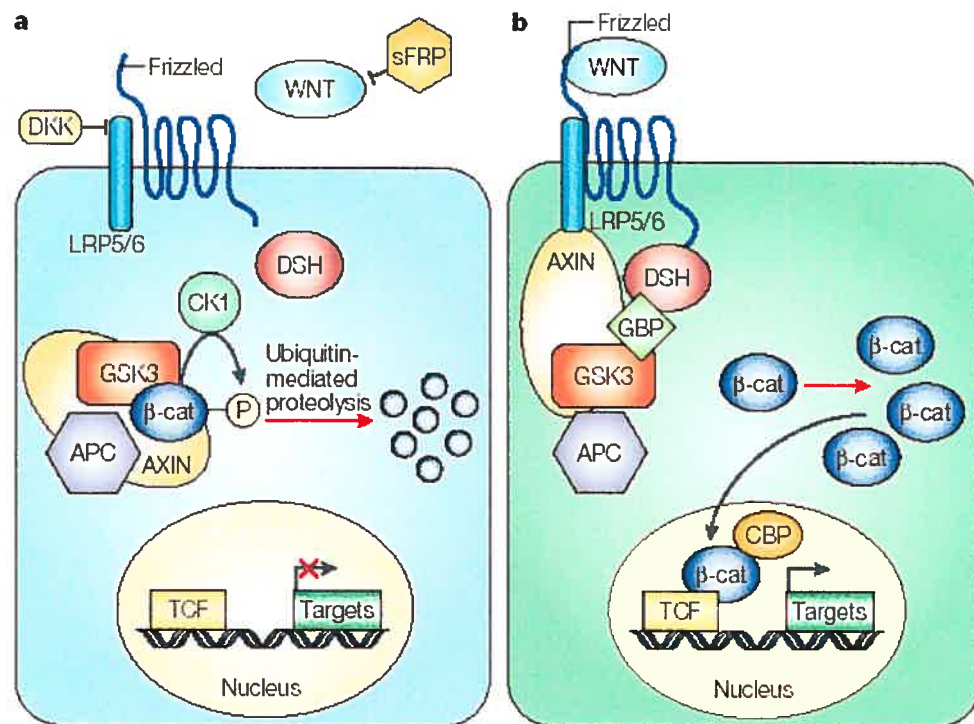


Figure 7: La voie de signalisation de Wnt en a) absence de Wnt et b) présence de Wnt.

(Tiré de Moon RT, Kohn AD, De Ferrari GV, Kaykas A. WNT and beta catenin signalling diseases and therapies. Nat Rev Genet 2004; 5:691-701.)

2.1b) Le complexe multiprotéique de β -catenin /APC/AXIN1/2/GSK3- β

La stabilité de β -catenin est régulée par un complexe multiprotéique constitué des protéines APC, GSK3- β et AXIN1/2. Dans ce complexe, β -catenin est phosphorylé par GSK3- β , ce qui le désigne comme cible pour l'ubiquitination et la dégradation protéosomique. Il a été démontré récemment que plusieurs protéines interagissent avec des composantes de ce complexe. La structure de ces gènes est connue et certaines de ces interactions sont maintenant caractérisées. Toutefois, les mécanismes exacts de ces interactions moléculaires restent à élucider.

β -catenin est une protéine des jonctions adhérentes qui interagit avec le domaine cytoplasmique de E-cadherin, ce qui ancre le complexe de cadherin au cytosquelette de l'actine. β -catenin, produit protéique du gène CTNNB1, possède 16 exons et mesure 23.2 kb. Sa portion amino-terminale est impliquée dans sa stabilisation et contient le site de phosphorylation par GSK3- β et CK1. β -catenin est initialement phosphorylé par CK1 au niveau du résidu Ser 45 et est par la suite phosphorylé par GSK3- β , au niveau des résidus Thr 41, Ser 37 et Ser 33. Sa portion centrale contient des répétitions armadillo qui interagissent avec APC, E-cadherin et TCF/LEF (Figure 8). Sa portion carboxy-terminale possède le domaine d'activation transcriptionnelle.

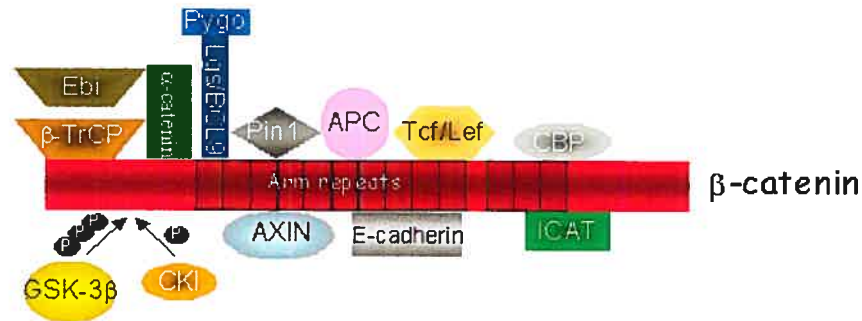


Figure 8: Structure du gène β -catenin (CTNNB1).

(Tiré du site : <http://atlasgeneticsoncology.org/Deep/WNTSignPathID20042.html>)

APC code pour une protéine nucléaire et cytoplasmique qui participe à plusieurs procédés cellulaires comme l'adhésion et la migration cellulaires, la transduction de signaux, l'assemblage de microtubules et la ségrégation de chromosomes. APC possède plusieurs domaines structuraux qui interagissent avec plusieurs protéines. Le gène APC contient 21 exons qui codent pour une protéine de 2 843 acides aminés. Trois séquences répétées de 15 acides aminées et sept séquences répétées de 20 acides aminées dans le gène APC lient β -catenin. APC est phosphorylé par GSK3- β ce qui augmente la charge négative sur APC et renforce ainsi l'interaction entre APC et β -catenin. AXIN1/2 se lie aux motifs Serine-Alanine-Methionine-Proline (SAMP) du gène APC. APC contient aussi des signaux de localisation nucléaire et des signaux d'exportation nucléaire. Les répétitions armadillo du gène APC lient plusieurs protéines dont la protéine phosphatase 2A (PP2A) (Figure 9).

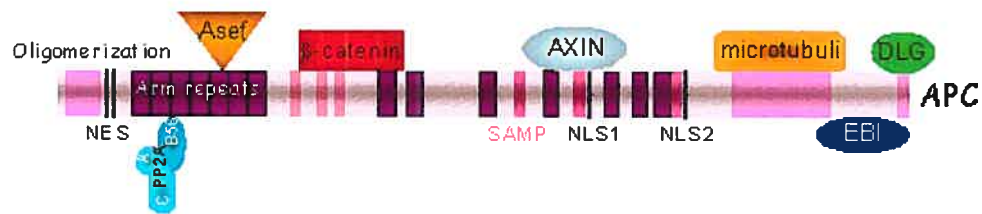


Figure 9: Structure du gène APC.

(Tiré du site : <http://atlasgeneticsoncology.org/Deep/WNTSignPathID20042.html>)

AXIN1/2 est une protéine d'échafaudage dans la formation du complexe multiprotéique. Il existe deux homologues chez l'humain : AXIN1 et AXIN2 qui possèdent environ 45% d'acides aminés identiques. La structure de leurs sites de liaison pour β -catenin, GSK3- β , APC et Dsh est très similaire. AXIN1 est exprimé de façon homogène durant le développement tandis que AXIN2 est exprimé dans certains tissus spécifiques et ce de manière temporelle. APC se lie à AXIN1/2 sur une région homologue à celle des régulateurs des protéines G située sur la portion amino-terminale. AXIN1/2 possède un domaine central qui lie GSK3- β et β -catenin, ce qui facilite leur interaction. GSK3- β interagit avec le complexe multiprotéique par l'intermédiaire de AXIN1/2 et puis phosphoryle AXIN1/2 et APC, ce qui augmente son interaction avec β -catenin. Le domaine DIX d'AXIN1/2 se lie à Dsh et LRP5, le corécepteur pour le ligand de Wnt. Ce domaine est aussi nécessaire pour l'oligomérisation d'AXIN1/2 (Figure 10).



Figure 10: Structure du gène de AXIN1/2.

(Tiré du site : <http://atlasgeneticsoncology.org/Deep/WNTSignPathID20042.html>)

GSK3- β est un membre de la famille des protéines sérine/thréonine kinases qui est aussi impliqué dans la régulation du glycogène par l'insuline et dans la survie cellulaire. Tel que mentionné ci-dessus, GSK3- β phosphoryle β -catenin avant sa dégradation protéosomique et phosphoryle aussi AXIN1/2 et APC, ce qui augmente l'interaction avec β -catenin. Lorsque Dsh se lie à AXIN1/2, cette phosphorylation est inhibée et la liaison de β -catenin est diminuée.

2.1c) Altération de la voie de Wnt dans les tumeurs solides

Chez l'humain, des études ont démontré l'implication de la voie de signalisation de Wnt dans la tumorigenèse. L'activation inappropriée de cette voie a été observée dans plusieurs cancers dont des tumeurs de la peau, du tube digestif, de l'ovaire et du foie (Lustig and Behrens 2003). En plus de APC, d'autres gènes de cette voie sont impliqués dans la cancérogenèse humaine.

β -catenin

L'exon 3 du gène CTNNB1 est un site de haute fréquence mutationnelle dans plusieurs tumeurs. Cet exon code pour les résidus sérine et thréonine, qui sont phosphorylés en premier lieu par CK1 (Ser 45) et ensuite par GSK3- β (Ser 33, ser 37 et thr 41). Des mutations dans cet exon augmentent la stabilité de la protéine β -catenin. La plupart des mutations sont des mutations faux-sens. Des mutations somatiques dans le gène CTNNB1 ont été identifiées dans le cancer colorectal, le cancer de l'endomètre, le mélanome, le cancer de l'ovaire, la tumeur de Wilms, le cancer de la prostate, le médulloblastome, l'hépatoblastome, le carcinome gastrique, la tumeur pancréatique, la tumeur desmoïde, le carcinome anaplasique de la thyroïde et le pilomatrixome (Karim, Tse et al. 2004). Les pilomatrixomes sont les tumeurs qui possèdent le plus haut taux de mutations de CTNNB1. Des mutations activatrices situées dans l'exon 3 de CTNNB1 ont été observées dans environ 30 à 100% des pilomatrixomes sporadiques (Kajino, Yamaguchi et al. 2001; Moreno-Bueno, Gamallo et al. 2001).

AXIN1/2

Une délétion dans l'exon 3 du gène AXIN1 a été rapportée dans le carcinome hépatocellulaire. Cette mutation élimine les deux sites de phosphorylation de GSK3- β et entraîne l'accumulation de β -catenin (Satoh, Daigo et al. 2000). Des mutations somatiques dans le domaine DIX d'AXIN1 ont aussi été détectées dans le cancer colorectal, elles éliminent l'interaction entre Dsh et AXIN1. D'autres mutations de

AXIN1 induisent une troncation de la protéine et ainsi une disparition de sites de liaison (Jin, Shao et al. 2003). L'exon 7 du gène AXIN2 contient 4 séquences répétées et ces séquences sont mutées dans environ 25% des carcinomes colorectaux avec une instabilité des microsatellites (Liu, Dong et al. 2000). Des mutations dans l'exon 7 du gène AXIN2 ont aussi été décrites dans un syndrome d'oligodontie qui prédispose au cancer colorectal (Lammi, Arte et al. 2004).

GSK3- β

Aucune mutation dans le gène de GSK3- β n'a été décrite à ce jour.

E-cadherin

E-cadherin est une molécule d'adhésion cellulaire qui interagit avec β -catenin dans l'assemblage et l'organisation des filaments d'actine. Des mutations germinales dans le gène de E-cadherin (CDH1) prédisposent à l'adénocarcinome gastrique héréditaire de forme diffuse selon Laurén (Guilford, Hopkins et al. 1998). Des mutations somatiques de CDH1 ont été démontrées dans plusieurs tumeurs telles que le carcinome lobulaire mammaire, le carcinome endométrial, le carcinome ovarien et le carcinome de l'estomac (Risinger, Berchuck et al. 1994; Berx, Cleton-Jansen et al. 1995; Ilyas, Tomlinson et al. 1997; Guilford, Hopkins et al. 1998; Richards, McKee et al. 1999).

LRP5

La perte de fonction du gène de LRP5 cause le syndrome ostéoporose-pseudogliome, qui est caractérisé par une cécité congénitale et une ostéoporose sévère dès le jeune âge (Gong, Slee et al. 2001). Des mutations germinales dans le gène de LRP5 sont impliquées dans plusieurs autres maladies osseuses, telles que l'ostéopétrose, l'hyperostose endostéale et l'ostéoporose, sans oublier les maladies héréditaires oculaires comme la vitréorétinopathie familiale exsudative (Van Wesenbeeck, Cleiren et al. 2003; Toomes, Bottomley et al. 2004).

2.2 Cancer colorectal héréditaire sans polypose (HNPCC ou syndrome de Lynch)

Le cancer colorectal héréditaire sans polypose (HNPCC) ou syndrome de Lynch se transmet de manière autosomique dominante et se retrouve généralement sur le côlon droit (Boland and Troncale 1984; Vasen, Mecklin et al. 1991). Les patients atteints de HNPCC ont un risque élevé de développer d'autres cancers dans plusieurs organes tels que l'endomètre, l'estomac, les ovaires, l'intestin grêle, le pancréas, la voie hépatobiliaire, les voies urinaires et le cerveau (Lynch and de la Chapelle 2003). La pénétrance de ce syndrome est d'environ 80% pour le cancer colorectal, 60% pour le cancer de l'endomètre et moins de 20% pour les autres cancers (de la Chapelle 2004; Hampel, Frankel et al. 2005). Ce syndrome est causé par une mutation constitutionnelle dans les gènes du système de réparation des mésappariements (MMR Mismatch repair system) de l'ADN tels que MSH2, MLH1, MSH6 et PMS2 par ordre décroissant de fréquence (Fishel, Lescoe et al. 1993; Leach, Nicolaides et

al. 1993; Peltomaki, Lothe et al. 1993; Nicolaides, Papadopoulos et al. 1994; Papadopoulos, Nicolaides et al. 1994; Kolodner, Tytell et al. 1999).

Le syndrome de Muir-Torre est une forme variante du syndrome de HNPCC. Il s'agit d'une maladie autosomique dominante, qui associe des tumeurs cutanées des glandes sébacées avec une ou plusieurs différentes tumeurs viscérales, en particulier des cancers de l'endomètre, des voies urinaires et des tumeurs gastrointestinales dont les cancers colorectaux (Ponti and Ponz de Leon 2005). Des mutations constitutionnelles dans les gènes de réparation des mésappariements MSH2 et MLH1 sont identifiées dans la plupart des patients atteints de ce syndrome. Il n'existe aucune corrélation génotype-phénotype dans ce syndrome. Par ailleurs, une mutation biallélique dans le gène de MYH a également été décrite chez un patient atteint du syndrome de Muir-Torre (Ponti, Ponz de Leon et al. 2005).

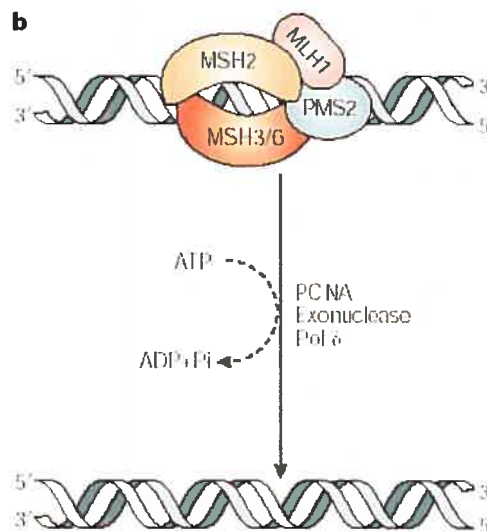


Figure 11: *Protéines impliquées dans le système de réparation des mésappariements.*

(Tiré de Umar A, Risinger JI, Hawk ET, Barrett JC. Testing guidelines for hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Nat Rev Cancer* 2004;4:153-8.)

Les gènes responsables de ces syndromes (MSH2, MSH3, MSH6, MLH1, PMS2) sont impliqués dans le contrôle de la fidélité de la réplication de l'ADN, en corrigeant les nucléotides mésappariés ainsi que les délétions et insertions causées par le glissement de l'ADN polymérase. La réparation de ces lésions nécessite de l'ATP et l'interaction avec d'autres protéines comme la PCNA (proliferating-cell nuclear antigen), une exonucléase et l'ADN polymérase (Figure 11) (Umar, Risinger et al. 2004). Le système de réparation des mésappariements de l'ADN remédie aux nucléotides mésappariés par le mécanisme suivant. Le nucléotide mésapparié doit être dégradé. La dégradation d'un mésappariement sur le brin sens commence à partir de l'extrémité 3' de l'amorce. Pour le brin non sens, un fragment d'Okazaki complet est enlevé par une dégradation qui commence à l'extrémité 3' ou 5'. Lorsque le foyer mésappariement a été enlevé, la polymérase synthétise la région dégradée (Figure 12).

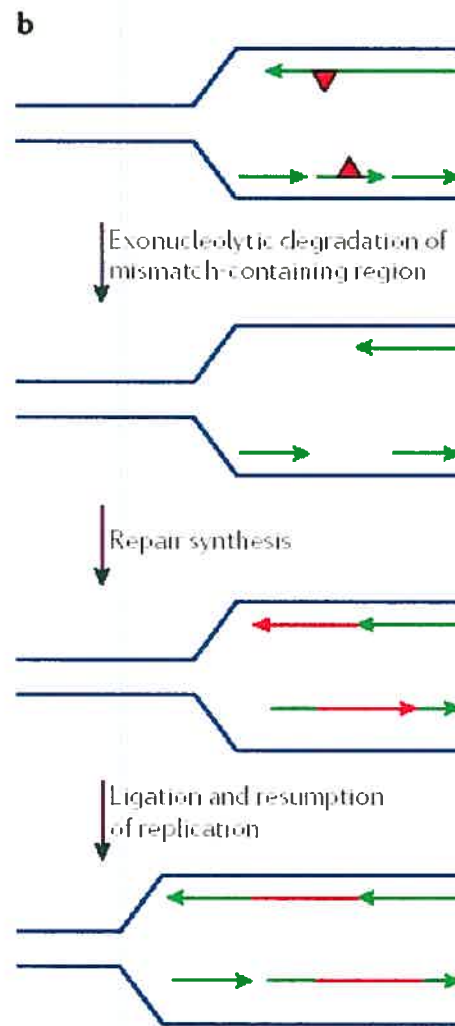


Figure 12: *Le système de réparation des mésappariements de l'ADN.*

(Tiré de Jiricny J. The multifaceted mismatch-repair system. Nat Rev Mol Cell Biol 2006;7:335-46.)

Le mécanisme de réparation des mésappariements a tout d'abord été caractérisé chez la bactérie *Escherichia coli*. Le système MMR eucaryotique est plus complexe et les protéines diffèrent selon la nature du mésappariement et du substrat pour l'excision (Kunkel and Erie 2005). Les protéines du système MMR participent à cette réparation sous forme d'hétérodimères. Les fonctions de chaque hétérodimère ne sont pas toutes connues. MSH2 et MSH6 reconnaissent les mésappariements, les délétions et les insertions de 1 ou 2 pb. MSH2 et MSH3 reconnaissent seulement les délétions et les insertions comportant plus de 2 pb. MLH1 et PMS2 forment un complexe tertiaire avec le nucléotide mésapparié et l'hétérodimère MSH2 et MSH6 et coordonnent ces liaisons. PCNA interagit et recrute les hétérodimères sur les nucléotides mésappariés (Kunkel and Erie 2005).

Plusieurs mésappariements de nucléotides surviennent lors des réplifications de l'ADN au moment de la mitose, particulièrement dans les régions répétitives de l'ADN, comme des séries de mononucléotides, de dinucléotides (CA)_n ou de trinucléotides (CAG)_n. Ces régions répétitives sont appelées microsatellites. Leurs séquences flanquantes sont connues et des amorces spécifiques permettent de les identifier et de les amplifier. Cette cartographie a été en partie réalisée par le Génethon (Dib, Faure et al. 1996). Ces séquences sont particulièrement sujettes à des erreurs de répllication, en raison de leur structure. Les gènes qui contiennent des microsatellites dans les régions codantes ont un risque plus élevé de mutations. Lorsque ces microsatellites sont présents dans des gènes qui régulent la croissance cellulaire et l'apoptose, une réparation déficiente va mener à des mutations "frameshifts" (décalage du cadre de

lecture), ce qui perturbe l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose. Le syndrome HNPCC et environ 15% des carcinomes colorectaux sporadiques sont caractérisés par une instabilité des microsatellites et donc par une réparation déficiente des mésappariements l'ADN (MMR deficient DNA mismatch repair) (Umar, Risinger et al. 2004; Jiricny 2006). Des mutations germinales dans les gènes du système de réparation des bases par l'excision ont été retrouvées dans 50% des patients atteints du syndrome de HNPCC (Brueckl, Jung et al. 2000). Une absence de mutations dans les gènes du MMR accompagnée d'une stabilité des microsatellites (MSS; microsatellite stability) peut aussi être observée chez les patients atteints du syndrome de Lynch. (de la Chapelle 2004).

Une inactivation des deux allèles de ces gènes du système MMR va entraîner une instabilité des microsatellites (MSI). Cependant, un individu porteur d'une mutation dans un seul allèle d'un gène MMR ne présente pas d'instabilité des microsatellites. Très tôt dans le processus de tumorigenèse, la fonction du gène va être perdue par l'altération du second allèle sain (perte d'allèle ou LOH) et l'apparition d'une cellule avec une réparation déficiente du mésappariement de l'ADN (appelée MMR-). Pour un même microsatellite, le nombre de ces répétitions varie au sein du tissu tumoral puisque le complexe de réparation de l'ADN des cellules MMR ne peut plus réparer les erreurs de réplication dans les séquences répétitives des microsatellites (Rowley 2005).

Une instabilité des microsatellites est un marqueur d'une déficience dans un gène du système MMR. Elle réfère à un gain ou à une perte dans le nombre de répétitions des microsatellites dans l'ADN de la tumeur, par rapport au nombre de répétitions dans de l'ADN normal provenant du même individu (Figure 13). Après amplification d'un microsatellite, le tissu normal présente 2 allèles distincts chez les hétérozygotes, alors que le tissu tumoral montrera plus de deux séquences. La multiplicité des bandes de l'ADN tumoral résulte de l'absence de correction des nucléotides mésappariés (Rowley 2005).

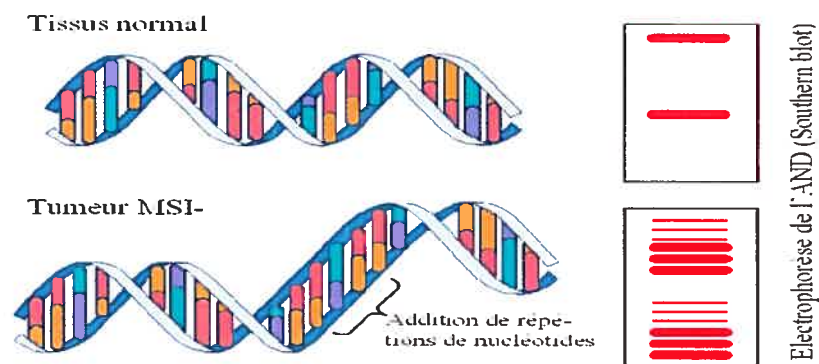


Figure 13: Détection d'une instabilité des microsatellites. Après amplification d'un microsatellite, le tissu normal comporte deux allèles distincts, tandis que le tissu tumoral montre plusieurs séquences issues de plusieurs cellules tumorales avec un nombre variable de répétitions des séquences d'ADN.

(Tiré du site : <http://www.and.s.dz/societe-anapath/resume2.htm>)

2.3 Polypose associée à MYH (MAP)

La polypose associée à MYH est une condition autosomique récessive qui prédispose au développement de quelques ou de multiple adénomes dans le côlon et dans le rectum (Al-Tassan, Chmiel et al. 2002; Sieber, Lipton et al. 2003). Ce syndrome est causé par des mutations bialléliques germinales dans le gène MYH. Ces tumeurs ne comportent pas de mutations dans le gène APC. L'incidence de cette mutation est d'environ 7-8 % chez les patients qui ont développé un phénotype de FAP, mais qui ne possèdent pas de mutation dans le gène APC. Plusieurs manifestations extra-coliques ont été décrites dans le cadre des polyposes associées à MYH. Cependant, ces manifestations demeurent peu documentées. Certains patients ont développé une polypose duodénale. Un cas de cancer gastrique a aussi été rapporté. Une hyperplasie congénitale de l'épithélium rétinien, un mélanome, des anomalies dentaires, des kystes dermoïdes et des ostéomes représentent d'autres associations décrites (Enholm, Hienonen et al. 2003; Sampson, Dolwani et al. 2003; Sieber, Lipton et al. 2003; Gismondi, Meta et al. 2004).

Les mutations les plus fréquentes du gène de MYH (MutYH) parmi les Caucasiens sont Y165C (qui comptent pour 53% des mutations décrites) et G382D (32% des mutations décrites) (Gismondi, Meta et al. 2004). Plus de 20 mutations pathogéniques ont été identifiées à ce jour (Figure 14). Des mutations non troncantes semblent se regrouper dans des domaines fonctionnels de MYH tandis que des mutations troncantes ont été identifiées au sein de la région codante. Des mutations

récurrentes ont été rapportées chez les patients italiens (1395 delGGA) et chez les patients portugais (1186-1187insGG) alors qu'une mutation tronquante (E446X) a été retrouvée dans des familles gujarati (Sampson, Jones et al. 2005). MYH est une glycosylase impliquée dans le système de réparation des bases par l'excision ou BER qui joue un rôle important dans la réparation des mutations causées par les radicaux libres durant le métabolisme aérobie (Cheadle and Sampson 2003).

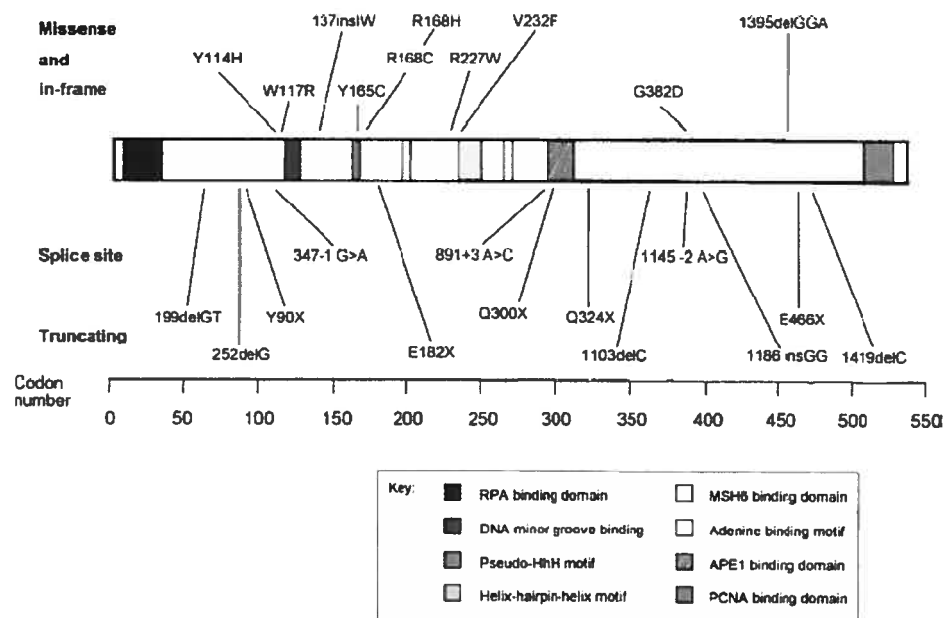


Figure 14: Liste des mutations pathogéniques affectant le gène de MYH.

(Tiré de Sampson JR, Jones S, Dolwani S, Cheadle JP. MutYH (MYH) and colorectal cancer. *Biochem Soc Trans* 2005;33:679-83)

2.3a) Le système de réparation des bases par l'excision

Le système de réparation des bases par l'excision (BER) répare principalement les bases oxydées et les AP (sites abasiques) consécutifs à l'action des radicaux libres induits par le stress oxydatif. On estime que 2×10^4 lésions moléculaires se produisent quotidiennement dans une cellule. La grande majorité de ces lésions est causée par des radicaux libres (reactive oxygen species, ROS). Le stress oxydatif est le résultat d'une production excessive de radicaux libres et/ou d'un système de défense anti-oxydant inadéquat, insuffisant à neutraliser les radicaux libres, constamment produits dans la cellule. Les principaux radicaux libres sont le radical superoxyde anion $\cdot O_2^-$, l'hydrogène peroxyde H_2O_2 et le radical hydroxyle $\cdot OH$. Les procédés métaboliques, comme le métabolisme oxydatif lors de la respiration mitochondriale et les procédés pathologiques, comme l'inflammation, sont des sources de radicaux libres endogènes. Les sources exogènes incluent l'exposition à la radiation ionisante et aux composés chimiques (Barzilai and Yamamoto 2004). Même si ces molécules réactives ont un rôle bénéfique dans l'activation de certaines voies de signalisation, elles sont aussi génotoxiques et oxydent l'ADN. Les radicaux libres oxydent les bases de l'ADN (oxidised base lesions) et les sites abasiques (AP) (Mitra, Boldogh et al. 2001).

Les bases oxydées et les AP sont réparés de façon prédominante par le système de réparation des bases par l'excision (BER). Le 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-OHdG ou 8-oxoG) est le principal produit d'oxydation de la cellule (Figure 15).

Cette forme oxydée de la base guanine se mésapparie avec l'adénine au lieu de la cytosine, ce qui crée des transversions A :T à C :C ou G :C à T :A. Chez la bactérie *Escherichia coli*, les enzymes mutM, mutY et mutT sont des glycosylases qui protègent contre l'effet mutagénique du 8-oxoG.

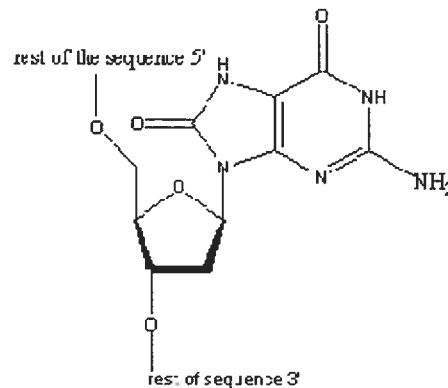


Figure 15: Structure de 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine.

(Tiré du site : www.oligos.com)

Plus spécifiquement, MutM enlève la base oxydée du mésappariement 8-oxoG :C. MutY excise l'adénine mésappariée opposée au 8-oxoG :C durant la réplication. MutT prévient l'incorporation du 8-oxodGMP sur le brin de l'ADN natif (Figure 16). Chez l'humain mutM correspond à OGG1, MutY à MutHY et MutT à MTH1 (Barzilai and Yamamoto 2004).

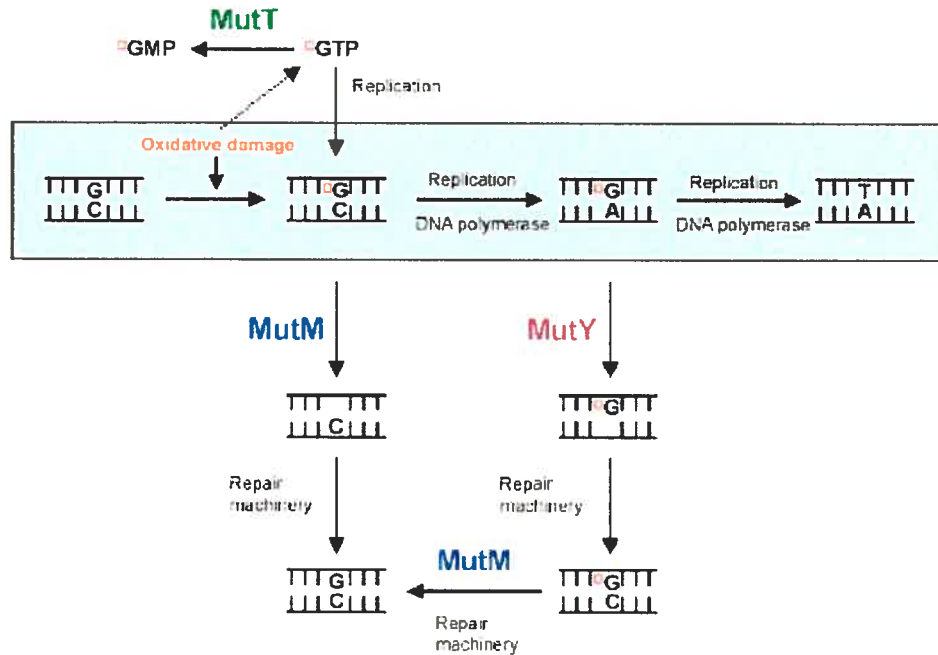


Figure 16: Rôles de *MutM*, *MutY* et *MutT*.

(Tiré de Cheadle JP, Sampson JR. Exposing the MYtH about base excision repair and human inherited disease. Hum Mol Genet 2003;12 Spec No 2:R159-65.)

Les glycosylases agissent dans la première étape du système BER. Une vue d'ensemble générale du système BER est présentée dans la figure 17. Après l'excision de la base oxydée (8-oxoG) par une glycosylase, le site abasique (AP) généré est coupé par l'endonucléase AP pour générer une extrémité 3'-OH et une extrémité 5'-deoxyribose phosphate (dRP). La polymérase β coupe le résidu dRP créant une absence de nucléotide entre le 3'-OH et le 5'-phosphate. La polymérase β va ajouter le nucléotide manquant et l'ADN ligase scelle l'espace entre les deux nucléotides (Mitra, Boldogh et al. 2001).

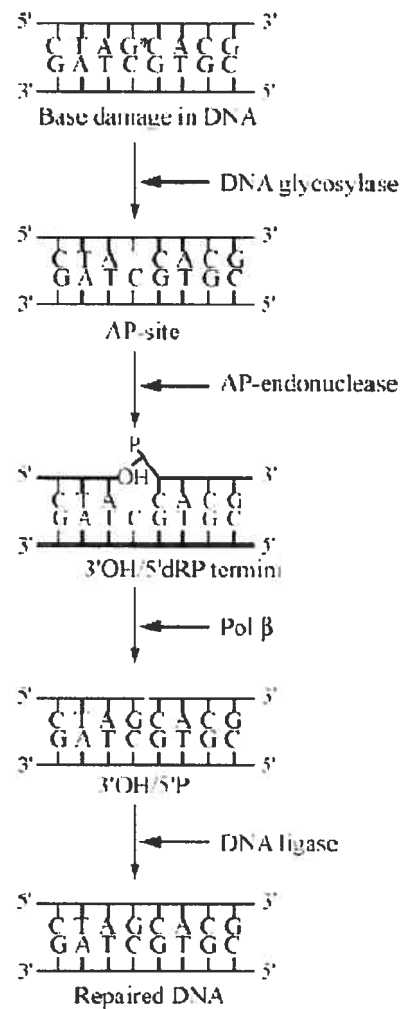


Figure 17: *Étapes du système de réparation des bases par l'excision.*

(Tiré de Mitra S, Boldogh I, Izumi T, Hazra TK. Complexities of the DNA base excision repair pathway for repair of oxidative DNA damage. *Environ Mol Mutagen* 2001;38:180-90.)

2.3b) Altération des enzymes du système BER dans le cancer

Jusqu'à la récente caractérisation de la polypose associée à MYH, aucune altération dans les gènes du système de BER n'avait été associée à une maladie. Des mutations dans le gène de MYH ne sont pas seulement retrouvées dans le cancer colorectal, deux mutations somatiques différentes du gène de MYH ayant aussi été rapportées chez des patients atteints d'un cancer gastrique sporadique et infectés par *Helicobacter pylori* (Kim, Cho et al. 2004). Les deux mutations étaient de type faux-sens et affectaient des acides aminés non conservés. En revanche, ces mutations étaient situées dans le domaine NUDIX de l'enzyme, qui est un domaine très conservé. Récemment, une association de polypose colorectale et de pilomatricomatose a été décrite chez un frère et une sœur, deux enfants issus de parents consanguins (cousins germains). Une mutation germinale a été retrouvée dans l'exon 13 du gène de MYH, induisant un codon stop prématuré (Baglioni, Melean et al. 2005).

Des pertes d'allèles (LOH) dans le locus du gène OGG1 ont été retrouvées dans des tumeurs pulmonaires. Une mutation intragénique a aussi été retrouvée dans une lignée cellulaire du poumon (Kohno, Shinmura et al. 1998). De plus, des mutations somatiques et plusieurs polymorphismes dans le gène de OGG1 ont été identifiées dans des carcinomes rénaux à cellules claires après des études d'hétérozygoté (Audebert, Chevillard et al. 2000). Ces mutations résultaient d'un changement d'acide aminé, réduisant l'activité enzymatique de la protéine OGG1 et donc

diminuant sa capacité à réparer les bases oxydées (Audebert, Chevillard et al. 2000). Dans cette étude, les auteurs ont aussi décrits d'autres isoformes de OGG1 qui sont produits du à un épissage alternatif aberrant. Leur impact sur le cancer est actuellement étudié. Par exemple, le polymorphisme R154H du gène de OGG1 est associé avec la FAP et le cancer colorectal sporadique (Kim, Ku et al. 2004). Aucune mutation germinale dans le gène de OGG1 n'a été rapportée dans la littérature.

Aucune mutation dans le gène MTH1 n'a été décrite à ce jour.

3. Pilomatrixome

Le pilomatrixome représente le deuxième élément clinique de notre association. Il s'agit d'une tumeur cutanée rare, avec une incidence de moins de un pourcent dans la population générale, qui survient avant l'âge de 20 ans. Cette tumeur bénigne est composée de cellules épithéliales de la matrice du follicule pileux qui se momifient et peuvent également se calcifier. La lésion se présente comme une tumeur dermique sous-cutanée ou profonde, isolée et dure, localisée généralement sur le visage, le cou et les membres supérieurs (Figure 18). La pilomatricomatose correspond à l'association de multiple pilomatrixomes chez un seul individu (Geiser 1960). La pilomatricomatose familiale est très rare et se transmet de manière autosomique dominante. Une seule famille a été décrite à ce jour (Karpuzoglu, Elpek et al. 2003). La présence de pilomatrixomes multiples a été observée en association avec la spina bifida (Pielop and Metry 2005), la trisomie 9 (Matsuura, Hatamochi et al. 2002), la

dystrophie myotonique (Geh and Moss 1999) et avec le syndrome de Rubinstein-Taybi (Cambiaghi, Ermacora et al. 1994). Entre 30 % et 100 % des pilomatrixomes contiennent des mutations somatiques activatrices dans l'exon 3 du gène β -catenin (Chan, Gat et al. 1999; Chan 2000; Kajino, Yamaguchi et al. 2001; Moreno-Bueno, Gamallo et al. 2001; Hassanein, Glanz et al. 2003; Lazar, Calonje et al. 2005).

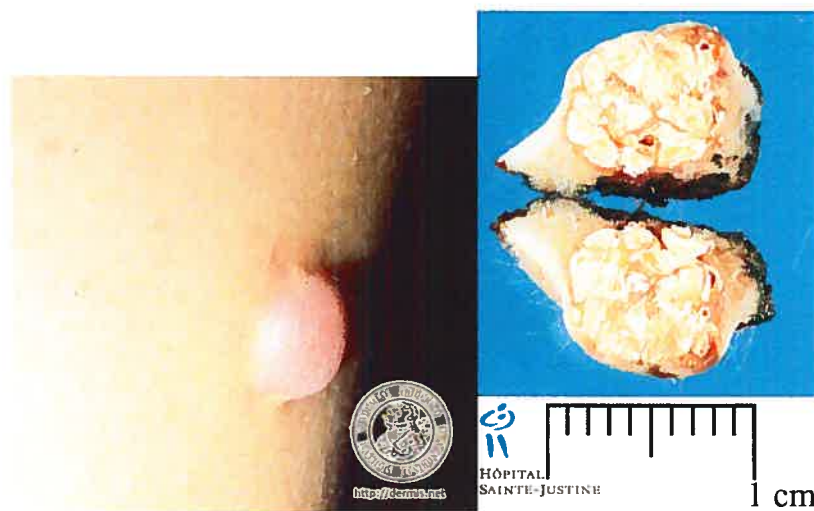


Figure 18: *Présentation clinique et image macroscopique d'un pilomatrixome, en coupe longitudinale.*

(Tiré du site : <http://dermis.multimedica.de/dermisroot/en/22051/diagnose.htm> et du Département de Pathologie, CHU Sainte-Justine, Montréal.)

CHAPITRE II : HYPOTHÈSE

Nous croyons que la présence simultanée d'une adénomatose colorectale et d'une pilomatricomatose chez deux patients non apparentés n'est pas une association fortuite et que cette association représente une nouvelle entité clinique.

Des mutations somatiques dans les gènes codant pour les protéines de la voie Wnt ont été décrites dans les deux tumeurs de cette association. Des mutations dans le gène β -catenin (CTNNB1) ont été retrouvées dans 30% à 100% des pilomatrixomes (Chan, Gat et al. 1999; Kajino, Yamaguchi et al. 2001; Moreno-Bueno, Gamallo et al. 2001) et des mutations dans le gène APC causent une polypose familiale adénomateuse (Grodin, Thliveris et al. 1991; Kinzler, Nilbert et al. 1991). Nous croyons que ce nouveau syndrome de prédisposition tumorale pourrait également être dû à une altération génétique de la voie de signalisation de Wnt. Plus précisément, nous comptons rechercher des mutations, soit par test de troncation des protéines ou par séquençage, dans les gènes de APC, β -catenin et AXIN2.

Récemment, un article rapportant cette association a été publié par Baglioni *et al.* (Baglioni, Melean et al. 2005). Dans cet article, une mutation dans le gène MYH a été retrouvée chez deux enfants issus de parents consanguins. La seconde hypothèse que nous émettons est celle d'une anomalie génétique dans une des enzymes du système BER ou d'un autre système de réparation comme le système de réparation des mésappariements. Nous désirons séquencer les gènes du BER et tester les adénomes colorectaux à la recherche d'une instabilité des microsatellites. Nous voulons identifier le ou les gènes responsables de cette association afin de caractériser cette association tant sur le plan constitutionnel que somatique.

ÉTAPES DE NOTRE TRAVAIL

Tout d'abord, nous nous sommes concentrés sur les études constitutionnelles, réalisées à partir de l'ADN extrait du sang de nos patients. Nous avons recherché des mutations germinales, par séquençage manuel, dans les gènes candidats suivants :

- le gène APC
- le gène β -catenin
- le gène AXIN2
- les enzymes du système BER : MYH, OGG1 et MTH1

Les résultats de cette première étude ont fait l'objet du premier article.

Ensuite, nous avons caractérisé, de façon somatique, les tumeurs impliquées dans cette association.

- Nous avons étudié l'expression *in situ* de β -catenin.
- Nous avons recherché des pertes d'allèles dans le gène APC.
- Nous avons étudié l'instabilité des microsatellites.

Les résultats de cette deuxième étude ont fait l'objet du deuxième article.

CHAPITRE III : OBJECTIFS DU PROJET

L'objectif général du projet est :

1. Identifier et caractériser les gènes responsables de cette nouvelle entité clinique qui associe des adénomes colorectaux et des pilomatrixomes.

Les objectifs spécifiques du projet sont :

1. Sur le plan constitutionnel, nous voulons tout d'abord identifier et ensuite caractériser les gènes impliqués dans cette association.
2. Sur le plan somatique, nous voulons caractériser de façon moléculaire et immunohistochimique, les altérations génétiques présentes dans les adénomes colorectaux et les pilomatrixomes de nos deux patients

Ce projet tend à identifier une nouvelle entité clinique, afin de permettre un meilleur diagnostic et une classification plus appropriée de ce syndrome de prédisposition au cancer colorectal. Finalement, la prise en charge de ce syndrome rare sera améliorée. Le traitement de ces patients sera plus spécifique et plus orienté à leur maladie.

CHAPITRE IV: ARTICLE 1:

Association of pilomatricomatosis and colorectal adenomatosis

Article en préparation

Contribution des auteurs :

K. D. Jacob : a effectué l'ensemble des expériences, a effectué l'analyse des données et a écrit l'article.

J. L. Michaud: est le généticien qui suit les familles et a corrigé l'article.

D. Bouron-Dal Soglio : a participé à l'écriture de l'article.

E. E. Papp : a participé à l'analyse des données.

E. Drouin: est le gastro-entérologue qui suit les familles et a obtenu les consentements.

J. Dassa : est la gastro-entérologue qui suit les familles et a écrit les résumés cliniques.

J. Powell: est la dermatologue qui suit les familles et qui nous a référé les familles.

L. L. Oligny: a corrigé l'article.

J. C. Fournet: est pathologiste, a supervisé le laboratoire et a corrigé l'article.

Association of pilomatricomatosis and colorectal adenomatosis

K D Jacob^{1,2,3}, J L Michaud^{1,4,7}, D Bouron-Dal Soglio^{1,2,3}, E E Papp^{1,2,3}, J Dassa^{4,5}, E Drouin^{4,5}, J Powell^{4,6}, L L Oligny^{1,2,3}, J C Fournet^{1,2,3} *

¹Research Centre, CHU Sainte-Justine, Montreal, QC, Canada.

²Department of Pathology, CHU Sainte-Justine, Montreal, QC, Canada.

³Department of Pathology and Cellular Biology, Université de Montreal, Montreal, QC, Canada.

⁴Department of Pediatrics, CHU Sainte-Justine, Montreal, QC, Canada

⁵Division of Gastroenterology, CHU Sainte-Justine, Montreal, QC, Canada

⁶Division of Dermatology, CHU Sainte-Justine, Montreal, QC, Canada.⁵

⁷Division of Medical Genetics, CHU Sainte-Justine, Montreal, QC, Canada.

***Corresponding author:** Jean-Christophe Fournet, MD, PhD
 Department of Pathology
 CHU Sainte-Justine
 3175, Chemin Côte Ste-Catherine
 Montreal, Quebec
 Canada H3T 1C5
 Phone: (514) 345-4931 ext. 5351
 Fax: (514) 345-4819
 Email address: [REDACTED]

Running title: Pilomatricomatosis-colorectal adenomatosis

Key words: pilomatricomas, colorectal adenomas, colorectal polyposis, tumor predisposition syndrome

ABSTRACT

The principal syndromes predisposing to colorectal cancer (CRC) are hereditary non polyposis colorectal cancer (HNPCC), familial adenomatous polyposis (FAP) and *MYH* associated polyposis (MAP). FAP is due to mutations in the *APC* gene, which result in the activation of the *WNT* signaling pathway. Interestingly, pilomatricomas, a benign tumor of the skin, have also been associated with activation of this pathway as well as with loss of *MYH* function. Herein, we report two unrelated patients with an association of colorectal adenomas and multiple pilomatricomas. In these two patients, FAP and the related Gardner syndrome were excluded by the absence of extraintestinal manifestations and a negative *APC* truncation test. Analysis of genomic DNA did not reveal any mutation in exon 3 of *CTNNB1* nor in exon 7 of *AXIN2*, which are components of the *WNT* signaling pathway. Direct sequencing of all coding exons of *MYH*, *OGGI* and *MTH1*, which codes for the three enzymes of the base excision system, was negative for germline mutations. Thus, the association of pilomatricomas and colorectal cancer described here is not associated with disruption of *APC* or *MYH*. We postulate that this association is not fortuitous and could represent a new predisposition syndrome to colorectal cancer.

INTRODUCTION

Colorectal cancer (CRC) is the third most common cancer and the fourth most frequent cause of cancer death worldwide. About 20% of all patients with colorectal cancer are estimated to have a positive family history without fulfilling the strict criteria for hereditary CRC ¹. The two main CRC predisposition syndromes are hereditary non polyposis colorectal cancer (HNPCC) and familial adenomatous polyposis (FAP) ¹.

HNPCC is an autosomal dominant disorder characterized by a family history of early onset CRC and other cancers in the absence of florid polyposis. It is mainly caused by mutations in the DNA mismatch repair genes *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* and *PMS2* ². FAP is an autosomal dominant syndrome characterised by the early development of hundreds to thousands of intestinal adenomatous polyps and an increased risk of extracolonic tumors ³. It is due to germline mutations in the adenomatous polyposis coli (*APC*) gene, located on chromosome 5q21 ⁴⁻⁶. Gardner syndrome is a clinical variant of FAP that is characterized by the presence of extra-intestinal manifestations (cutaneous, ophthalmologic, osseous, dental, etc) in addition to polyposis. It is caused by germline mutations of the *APC* gene, typically between codons 1403 and 1578. APC is a regulator of the WNT signalling pathway ^{7,8}.

Recently, a third CRC predisposition syndrome, *MYH*-associated polyposis (MAP), has been described. MAP is an autosomal recessive condition predisposing to multiple colorectal adenomas or adenomatous polyps that are *APC* mutation negative ^{9 10, 11}. *MYH* is a glycosylase involved in the base excision repair (BER) pathway that plays an important role in the repair of DNA mutations

caused by reactive oxygen species generated during aerobic metabolism ¹². Interestingly, Baglioni *et al.* reported a kindred with *MYH*-associated polyposis and pilomatricomas ¹³. Pilomatricoma is a benign appendageal tumor with differentiation toward hair cells that usually manifests as a solitary, asymptomatic, firm nodule ¹⁴. Activating mutations of the β -catenin gene (*CTNNB1*) have been found in 30% to 100% of sporadic pilomatricomas ^{15, 16}.

Here, we report two new and unrelated patients who showed colonic adenomas and multiple pilomatricomas, suggesting that this association represents a new clinical entity. By molecular analysis, we have excluded germline mutations in genes acting along the WNT and BER pathways.

MATERIALS AND METHODS

Subjects

Patient I. Multiple pilomatricomatosis was diagnosed in a 14-year-old boy. Ten lesions located on the arm, head and neck were surgically removed. The family history revealed that his father was affected by an inflammatory bowel disease and that his paternal grandfather was known to have intestinal polyps. Colonoscopy of the patient showed at least 10 polyps disseminated in the sigmoid colon, transverse colon and rectum (Figure 1 and 2). Polyps were endoscopically removed. Histologically, they corresponded to tubulous adenomas with mild dysplasia. Screening for Gardner syndrome associated abnormalities, including osteomas, fibromas, and retinal pigmented epithelium lesions, was negative. (Pour l'arbre généalogique, se référer à l'annexe IV, Figure 20)

Patient II. Patient II is a 9-year-old girl who was referred at 5 years of age for three pilomatricomas and hypertrichosis. Pilomatricomas located on her back and arms were surgically removed. Her father also had hypertrichosis but had no pilomatricomas. The father of the paternal grandmother died of colon cancer. Intestinal polyposis was observed in the paternal great uncles and great aunts. The patient underwent colonoscopic examination and two polyps were detected in the sigmoid colon. Polyps were removed endoscopically and were histologically diagnosed as tubulous adenomas with mild dysplasia (Figure 1 and 2). A screening for Gardner syndrome associated abnormalities, including osteomas, fibromas, and retinal pigmented epithelium lesions, was negative. . (Pour l'arbre généalogique, se référer à l'annexe IV, Figure 21)

APC truncation Test

DNA and RNA of the 2 patients were analyzed for mutations in the entire coding region of the *APC* gene using the protein truncation test. The *APC* gene was analyzed in 6 overlapping segments. About 90% of genetic alterations in the *APC* gene are detected using this test.¹⁷⁻¹⁹.

Mutation analysis

Mutation analysis of the coding exons and of the flanking intronic sequences of *CTNNB1*, *AXIN2*, *MYH*, *OGG1* and *MTH1* was conducted by polymerase chain reaction (PCR) amplifications and DNA sequencing. DNA was extracted from peripheral blood according to standard methods. *CTNNB1* exon 3 was amplified by PCR using primers and conditions described by Doglioni *et al.*²⁰. *AXIN2* exon 7 was amplified by PCR using primers and conditions previously described²¹. Three BER genes, *MYH*, *OGG1* and *MTH1*, were amplified by PCR using primers and conditions described by Al-Tassan *et al.*⁹ (se référer à l'annexe I, tableaux II, III, IV, V, VI, VII à la fin du mémoire) . The resulting PCR products were evaluated on 1% ethidium bromide stained gels and were purified using the Rapid PCR purification system (Marligen Biosciences, Ijamsville, Maryland, USA). Next, they were sequenced directly using the Thermo Sequenase cycle sequencing kit (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK) according to manufacturer's instructions with the same primers used for PCR amplification. Products of the cycle sequencing reaction were resolved on 7% polyacrylamide denaturing gels. Results were confirmed by repeating each PCR and direct sequencing reaction.

RESULTS

An association of colorectal adenomatous polyposis and of multiple pilomatricomatosis was found in our two patients (Figure 1 and 2). Gardner syndrome was unlikely in view of the fact that we failed to detect osteomas, retinal pigmented epithelium lesions, dental abnormalities and desmoid tumors in these patients ⁷. In order to further exclude this diagnosis, APC protein truncation tests were performed but suggested no mutation in the *APC* gene of these patients.

We next investigated *CTNNB1* and *AXIN2*, two other genes coding for components of the WNT signalling pathway. Activating mutations in *CTNNB1*, which codes for β -catenin, are found in 30 to 100% of sporadic pilomatricomas ¹⁵, ¹⁶. These mutations involve almost exclusively codons 33, 44, and 45, which are located in the 3rd exon ²²⁻²⁴. Mutations in exon 7 of *AXIN2* are also associated with colorectal tumors ^{21, 25}. Sequence analysis did not detect any mutations in exon 3 of *CTNNB1* or in exon 7 of *AXIN2* in the two patients.

Baglioni *et al* ¹³ described a kindred affected by adenomatous polyposis and multiple pilomatricomatosis. They found that this association was due to a mutation in the *MYH* gene, which codes for a glycosylase involved in the base excision repair pathway (BER). We investigated the possible involvement of the BER pathway by sequencing all coding exons and flanking intronic sequences of *MYH*, *OGG1* and *MTH1*, which code for the three BER enzymes. Patient I showed 3 known single nucleotide polymorphisms in the *MYH* gene that don't have any known phenotypic effect and therefore not known to cause a disease. However, the analysis failed to detect any pathogenic mutation in the patients.

DISCUSSION

Pilomatricoma is a frequent benign, calcifying cutaneous tumor of the hair matrix cells. It usually manifests as a solitary, asymptomatic, firm nodule. Pilomatricomatosis is the association of multiple pilomatricomas in one individual. Familial multiple pilomatricomas are very rare, and usually show an autosomal dominant pattern of inheritance ²⁶. A single multiple pilomatricoma family, with three affected siblings has been described ²⁷. Multiple pilomatricomas have been observed in association with spina bifida ²⁸, trisomy 9 ²⁹, myotonic dystrophy ³⁰, and in Rubinstein-Taybi syndrome ³¹.

Only one association of familial multiple pilomatricomas and Gardner syndrome has been reported in the literature ³². In this article, the father and the son had numerous lesions that corresponded histologically to pilomatrimacommas. After complete examination, the father was found to have Gardner associated tumors including: adenomatous polyps, a typical hyperplasia of the retinal pigmented epithelium and dental anomalies. Intestinal polyps were not found in the child. APC protein truncation tests were not performed to confirm the diagnosis of Gardner syndrome. The authors suggested that multiple familial pilomatricomas could be considered in some instances as a cutaneous marker for Gardner syndrome. However, other cases with this association have not yet been reported in the literature. In our two patients, Gardner syndrome was excluded by the absence of Gardner associated tumors and by the absence of truncating mutations in the *APC* gene. The protein truncation test can detect 90% of the APC genetic alterations ¹⁷⁻¹⁹.

The WNT signalling pathway has been implicated in the development of a variety of human malignancies, including skin, gastrointestinal, ovarian and

hepatocellular tumors³³. Mutations in *APC* gene, a protein required for ubiquitin-mediated degradation of β -catenin, lead to chronic activation of the WNT signalling pathway. β -catenin is the central effector for the activation of target gene transcription in response to WNT signalling and is regulated by a multiprotein complex consisting of APC, AXIN1, AXIN2 and GSK-3. Beta-catenin-activating mutations located in exon 3 are found in 30% to 100% of cases of pilomatricomas. No germline mutation in exon 3 of *CTNNB1* was detected in our two patients. In fact, no germline mutation in *CTNNB1* has been described to date. A constitutional mutation in β -catenin would probably have a lethal effect on the embryo. *AXIN1* and its homolog *AXIN2* act as scaffold components of the APC complex. Mutations affecting *AXIN1* and *AXIN2* genes have been shown to activate the WNT pathway and contribute to the development of colorectal tumors²⁵. More specifically, colorectal tumors with defective mismatch repair are associated with somatic mutations in exon 7 of *AXIN2*^{21, 25}. Sequencing of exon 7 of *AXIN2* using genomic DNA of our two patients did not reveal any germline mutation. Although neither *CTNNB1* nor *AXIN2* mutations were found in these samples, it is still possible that germline mutations somewhere else in these genes or in other genes coding for components of the APC complex, such as *AXIN1*, cause tumor development.

MAP is an autosomal recessive syndrome with a high colorectal cancer risk that is caused by biallelic mutations in the *MYH* gene. In humans, *MYH*, *OGG1* and *MTH1* code for three glycosylases of the BER pathway, which repairs the oxidative damage that occurs in DNA⁹. Oxidative damage converts guanine into 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxo-G) which mispairs with

adenine, resulting in G:C → T:A transversion mutations ³⁴. *MYH*, *OGGI* and *MTH1* function in consort to identify and repair 8-oxo G incorporated into DNA.

Extracolonic manifestations have also been described in association with MAP. However, these manifestations remain poorly documented. Duodenal polyposis, gastric cancer, congenital hyperplasia of the retinal epithelium, dental anomalies, melanoma, dermoid cysts and osteomas have been reported^{11, 35-37}. Interestingly, similar extracolonic manifestations are observed in patients with polyposis who have germline mutation APC. In our two patients, MAP syndrome is unlikely due to the absence of mutations in *MYH*. This observation strongly suggests that the association of pilomatricomas and colorectal adenomas may have a different etiology than the one reported by Baglioni *et al.* ¹³. Moreover, we also tested *OGGI* and *MTH1*, the two other genes of the BER pathway. Our two patients were negative for mutations in these genes. Germline mutations in *OGGI* and *MTH1* have not yet been identified ³⁸.

In conclusion, the association of multiple pilomatricomas and colorectal adenomas that we have reported here is not linked to Gardner syndrome, nor to a MYH-associated polyposis. We believe that this association represents a new predisposition disease to colorectal carcinoma. Even though the exact etiology of this association remains to be defined, we suggest that patients affected by multiple pilomatricomatosis should be tested for colorectal adenomatosis and tumor predisposition.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would acknowledge Canadian Dermatology Foundation (<http://www.cdf.ca>) for funding of this project. We wish to thank the Research Center of CHU Ste-Justine which provided grant support for this study and Dr. Émile Levy for his support. We are grateful to Dr. Daniel Sinnett for his continuous support, Dr. Benoit Panzini for stimulating discussions and Dr. George Chong for APC truncation tests. We also want to thank Jennifer Fitzpatrick for her careful review of the manuscript. Karine Jacob and Eniko Papp are supported by a grant of the Research Center of CHU Ste-Justine, the Department of pathology of the CHU Sainte-Justine, and the Department of pathology and cellular biology of the Université de Montréal.

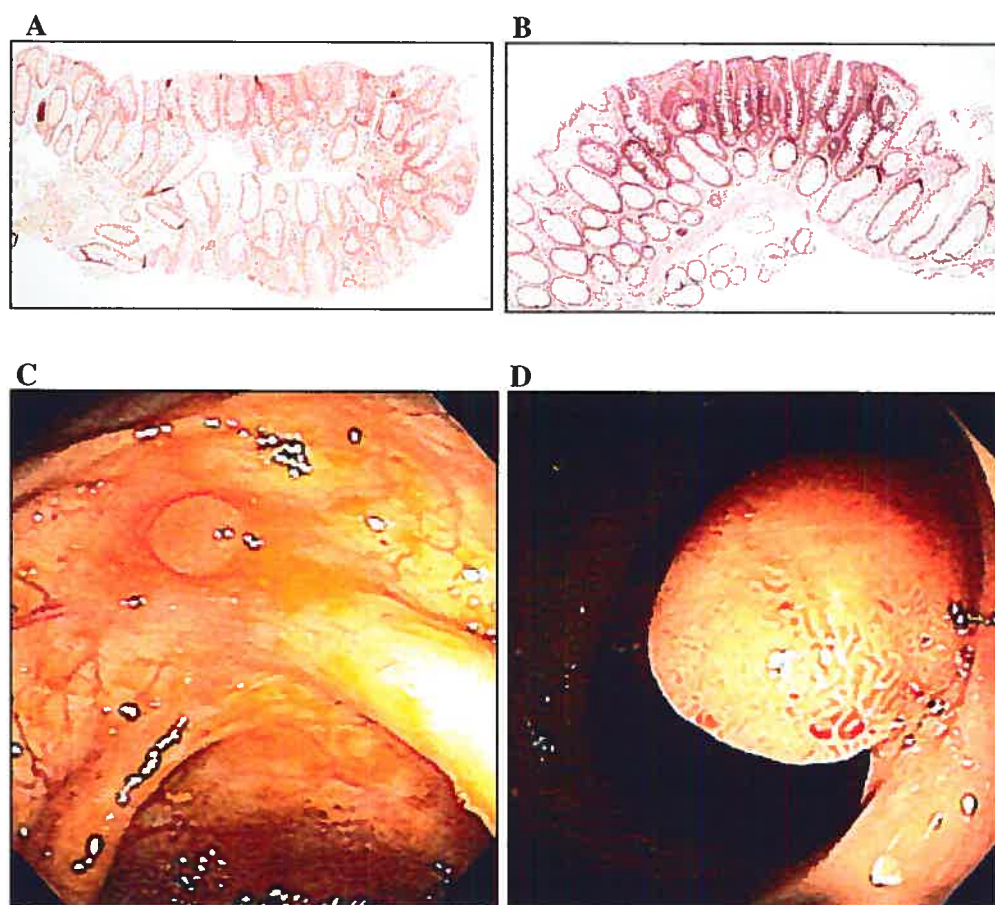
FIGURES

Figure 1: Microscopic Adenoma from patient I (a) and patient II (b).
Macroscopic view of the adenoma from patient I (c) and patient II (d).

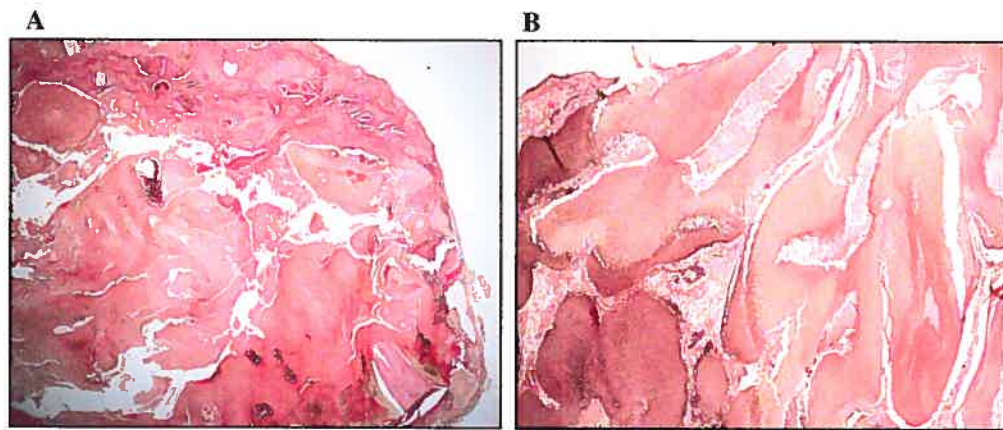


Figure 2: Pilomatricoma from patient I (a) and patient II (b) (H&E stain; x40).

REFERENCES

1. **Lynch HT, de la Chapelle A.** Hereditary colorectal cancer. *N Engl J Med* 2003;**348**:919-32.
2. **Hampel H, Frankel WL, Martin E, Arnold M, Khanduja K, Kuebler P, Nakagawa H, Sotamaa K, Prior TW, Westman J, Panescu J, Fix D, Lockman J, Comeras I, de la Chapelle A.** Screening for the Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer). *N Engl J Med* 2005;**352**:1851-60.
3. **Rowley PT.** Inherited susceptibility to colorectal cancer. *Annu Rev Med* 2005;**56**:539-54.
4. **Kinzler KW, Nilbert MC, Su LK, Vogelstein B, Bryan TM, Levy DB, Smith KJ, Preisinger AC, Hedge P, McKechnie D, et al.** Identification of FAP locus genes from chromosome 5q21. *Science* 1991;**253**:661-5.
5. **Groden J, Thliveris A, Samowitz W, Carlson M, Gelbert L, Albertsen H, Joslyn G, Stevens J, Spirio L, Robertson M, et al.** Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene. *Cell* 1991;**66**:589-600.
6. **Nishisho I, Nakamura Y, Miyoshi Y, Miki Y, Ando H, Horii A, Koyama K, Utsunomiya J, Baba S, Hedge P.** Mutations of chromosome 5q21 genes in FAP and colorectal cancer patients. *Science* 1991;**253**:665-9.
7. **Gardner EJ.** Follow-up study of a family group exhibiting dominant inheritance for a syndrome including intestinal polyps, osteomas, fibromas and epidermal cysts. *Am J Hum Genet* 1962;**14**:376-90.

8. **de la Chapelle A.** Genetic predisposition to colorectal cancer. *Nat Rev Cancer* 2004;**4**:769-80.
9. **Al-Tassan N, Chmiel NH, Maynard J, Fleming N, Livingston AL, Williams GT, Hodges AK, Davies DR, David SS, Sampson JR, Cheadle JP.** Inherited variants of MYH associated with somatic G:C-->T:A mutations in colorectal tumors. *Nat Genet* 2002;**30**:227-32.
10. **Venesio T, Molatore S, Cattaneo F, Arrigoni A, Risio M, Ranzani GN.** High frequency of MYH gene mutations in a subset of patients with familial adenomatous polyposis. *Gastroenterology* 2004;**126**:1681-5.
11. **Sieber OM, Lipton L, Crabtree M, Heinimann K, Fidalgo P, Phillips RK, Bisgaard ML, Orntoft TF, Aaltonen LA, Hodgson SV, Thomas HJ, Tomlinson IP.** Multiple colorectal adenomas, classic adenomatous polyposis, and germ-line mutations in MYH. *N Engl J Med* 2003;**348**:791-9.
12. **Lindahl T.** Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* 1993;**362**:709-15.
13. **Baglioni S, Melean G, Gensini F, Santucci M, Scatizzi M, Papi L, Genuardi M.** A kindred with MYH-associated polyposis and pilomatricomas. *Am J Med Genet A* 2005;**134**:212-4.
14. **Chan EF, Gat U, McNiff JM, Fuchs E.** A common human skin tumour is caused by activating mutations in beta-catenin. *Nat Genet* 1999;**21**:410-3.
15. **Kajino Y, Yamaguchi A, Hashimoto N, Matsuura A, Sato N, Kikuchi K.** beta-Catenin gene mutation in human hair follicle-related tumors. *Pathol Int* 2001;**51**:543-8.

16. **Moreno-Bueno G, Gamallo C, Perez-Gallego L, Contreras F, Palacios J.** beta-catenin expression in pilomatrixomas. Relationship with beta-catenin gene mutations and comparison with beta-catenin expression in normal hair follicles. *Br J Dermatol* 2001;**145**:576-81.
17. **Bala S, Kraus C, Wijnen J, Meera Khan P, Ballhausen WG.** Multiple products in the protein truncation test due to alternative splicing in the adenomatous polyposis coli (APC) gene. *Hum Genet* 1996;**98**:528-33.
18. **Powell SM, Petersen GM, Krush AJ, Booker S, Jen J, Giardiello FM, Hamilton SR, Vogelstein B, Kinzler KW.** Molecular diagnosis of familial adenomatous polyposis. *N Engl J Med* 1993;**329**:1982-7.
19. **van der Luijt R, Khan PM, Vasen H, van Leeuwen C, Tops C, Roest P, den Dunnen J, Fodde R.** Rapid detection of translation-terminating mutations at the adenomatous polyposis coli (APC) gene by direct protein truncation test. *Genomics* 1994;**20**:1-4.
20. **Dogliani C, Piccinin S, Demontis S, Cangi MG, Pecciarini L, Chiarelli C, Armellin M, Vukosavljevic T, Boiocchi M, Maestro R.** Alterations of beta-catenin pathway in non-melanoma skin tumors: loss of alpha-ABC nuclear reactivity correlates with the presence of beta-catenin gene mutation. *Am J Pathol* 2003;**163**:2277-87.
21. **Lammi L, Arte S, Somer M, Jarvinen H, Lahermo P, Thesleff I, Pirinen S, Nieminen P.** Mutations in AXIN2 cause familial tooth agenesis and predispose to colorectal cancer. *Am J Hum Genet* 2004;**74**:1043-50.

22. **Morin PJ, Sparks AB, Korinek V, Barker N, Clevers H, Vogelstein B, Kinzler KW.** Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. *Science* 1997;**275**:1787-90.
23. **Iwao K, Nakamori S, Kameyama M, Imaoka S, Kinoshita M, Fukui T, Ishiguro S, Nakamura Y, Miyoshi Y.** Activation of the beta-catenin gene by interstitial deletions involving exon 3 in primary colorectal carcinomas without adenomatous polyposis coli mutations. *Cancer Res* 1998;**58**:1021-6.
24. **Sparks AB, Morin PJ, Vogelstein B, Kinzler KW.** Mutational analysis of the APC/beta-catenin/Tcf pathway in colorectal cancer. *Cancer Res* 1998;**58**:1130-4.
25. **Liu W, Dong X, Mai M, Seelan RS, Taniguchi K, Krishnadath KK, Halling KC, Cunningham JM, Boardman LA, Qian C, Christensen E, Schmidt SS, Roche PC, Smith DI, Thibodeau SN.** Mutations in AXIN2 cause colorectal cancer with defective mismatch repair by activating beta-catenin/TCF signalling. *Nat Genet* 2000;**26**:146-7.
26. **Grabczynska SA, Budny P, Calonje E, Ratnavel R.** Case 3: Multiple familial pilomatixoma. *Clin Exp Dermatol* 2002;**27**:343-4.
27. **Karpuzoglu T, Elpek GO, Alpsoy E, Gelen T, Aksoy NH, Karpuzoglu G.** Multiple familial pilomatixomas. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2003;**17**:358-9.
28. **Pielop JA, Metry D.** Multiple pilomatricomas in association with spina bifida. *Pediatr Dermatol* 2005;**22**:178-9.
29. **Matsuura H, Hatamochi A, Nakamura Y, Endo H, Shinkai H.** Multiple pilomatricoma in trisomy 9. *Dermatology* 2002;**204**:82-3.

30. **Geh JL, Moss AL.** Multiple pilomatrixomata and myotonic dystrophy: a familial association. *Br J Plast Surg* 1999;**52**:143-5.
31. **Cambiaghi S, Ermacora E, Brusasco A, Canzi L, Caputo R.** Multiple pilomatricomas in Rubinstein-Taybi syndrome: a case report. *Pediatr Dermatol* 1994;**11**:21-5.
32. **Pujol RM, Casanova JM, Egidio R, Pujol J, de Moragas JM.** Multiple familial pilomatricomas: a cutaneous marker for Gardner syndrome? *Pediatr Dermatol* 1995;**12**:331-5.
33. **Lustig B, Behrens J.** The Wnt signaling pathway and its role in tumor development. *J Cancer Res Clin Oncol* 2003;**129**:199-221.
34. **Nghiem Y, Cabrera M, Cupples CG, Miller JH.** The mutY gene: a mutator locus in Escherichia coli that generates G.C----T.A transversions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988;**85**:2709-13.
35. **Enholm S, Hienonen T, Suomalainen A, Lipton L, Tomlinson I, Karja V, Eskelinen M, Mecklin JP, Karhu A, Jarvinen HJ, Aaltonen LA.** Proportion and phenotype of MYH-associated colorectal neoplasia in a population-based series of Finnish colorectal cancer patients. *Am J Pathol* 2003;**163**:827-32.
36. **Gismondi V, Meta M, Bonelli L, Radice P, Sala P, Bertario L, Viel A, Fornasarig M, Arrigoni A, Gentile M, Ponz de Leon M, Anselmi L, Mareni C, Bruzzi P, Varesco L.** Prevalence of the Y165C, G382D and 1395delGGA germline mutations of the MYH gene in Italian patients with adenomatous polyposis coli and colorectal adenomas. *Int J Cancer* 2004;**109**:680-4.

37. **Sampson JR, Dolwani S, Jones S, Eccles D, Ellis A, Evans DG, Frayling I, Jordan S, Maher ER, Mak T, Maynard J, Pigatto F, Shaw J, Cheadle JP.** Autosomal recessive colorectal adenomatous polyposis due to inherited mutations of MYH. *Lancet* 2003;**362**:39-41.
38. **Kim IJ, Ku JL, Kang HC, Park JH, Yoon KA, Shin Y, Park HW, Jang SG, Lim SK, Han SY, Shin YK, Lee MR, Jeong SY, Shin HR, Lee JS, Kim WH, Park JG.** Mutational analysis of OGG1, MYH, MTH1 in FAP, HNPCC and sporadic colorectal cancer patients: R154H OGG1 polymorphism is associated with sporadic colorectal cancer patients. *Hum Genet* 2004;**115**:498-503.

CHAPITRE III: ARTICLE 2:

Genetic heterogeneity of the Pilomatrimacosis and Colorectal Adenomatosis

Syndrome (PCA syndrome)

Article en préparation

Contribution des auteurs :

K. D. Jacob : a réalisé l'ensemble des expériences, a fait l'analyse des données et a effectué la rédaction complète de cet article.

J. L. Michaud: est le généticien qui suit les familles et a corrigé l'article.

E. Drouin: est le gastro-entérologue qui suit les familles et a obtenu les consentements.

J. Powell: est la dermatologue qui suit les familles et qui nous a référé les familles.

L. L. Oigny: a corrigé l'article.

J. C. Fournet: est pathologiste, a supervisé les expériences dans le laboratoire et a corrigé l'article.

Genetic heterogeneity of the Pilomatrimacosis and Colorectal Adenomatosis Syndrome

K D Jacob^{1,2,3}, J L Michaud^{1,4,7}, J Powell^{4,6}, E Drouin^{4,5}, L L Oligny^{1,2,3}, J C Fournet^{1,2,3} *

¹Research Centre, CHU Sainte-Justine, Montreal, QC, Canada.

²Department of Pathology, CHU Sainte-Justine, Montreal, QC, Canada.

³Department of Pathology and Cellular Biology, Université de Montreal, Montreal, QC, Canada.

⁴Department of Pediatrics, CHU Sainte-Justine, Montreal, QC, Canada

⁵Division of Gastroenterology, CHU Sainte-Justine, Montreal, QC, Canada

⁶Division of Dermatology, CHU Sainte-Justine, Montreal, QC, Canada.⁵

⁷Division of Medical Genetics, CHU Sainte-Justine, Montreal, QC, Canada.

***Corresponding author:** Jean-Christophe Fournet, MD, PhD
Department of Pathology
CHU Sainte-Justine
3175, Chemin Côte Ste-Catherine
Montreal, Quebec
Canada H3T 1C5
Phone: (514) 345-4931 ext. 5351
Fax: (514) 345-4819
Email address: [REDACTED]

Running title: PCA syndrome

Key words: pilomatricomas, colorectal polyposis, tumor predisposition syndrome, somatic studies

ABSTRACT

The pilomatrimacosis and colorectal adenomatosis (PCA) syndrome is a new predisposition syndrome to colorectal cancer. This association was described by Baglioni *et al.* in 2005 in two siblings harbouring a mutation in *MYH* gene. We also reported two unrelated patients affected by the PCA syndrome but we did not identify a germline mutation. Here, we performed somatic studies to better characterise the tumor involved in this syndrome. Immunohistochemistry using a β -catenin antibody suggested a deregulation of the Wnt signaling pathway. Direct sequencing of exon 3 of β -catenin in the adenomas did not reveal any mutations. Loss of heterozygosity (LOH) studies performed in the locus of the *APC* genes did not reveal any LOH in both patients. Microsatellite instability (MSI) was observed in one of the adenoma of one patient. This MSI underlies a defect in genes involved in the mismatch repair system (MMR). We did not detect any mutation in the other patient. Thus, the PCA syndrome shows genetic heterogeneity and is a common phenotype for anomalies of the BER and MMR systems. We believe that another genetic alteration in both the BER and the MMR pathways may underlie the PCA syndrome. On a clinical perspective, we suggest that patients affected by pilomatrimacomas should be tested for colorectal adenomas and microsatellite instability.

INTRODUCTION

Three main predisposition syndromes to colorectal cancer have been described. Familial adenomatous polyposis (FAP) is caused by mutations in the APC gene and hereditary non polyposis colorectal cancer (HNPCC) is due to mutations in genes involved in the mismatch repair pathway. MYH associated polyposis (MAP) is defined by mutations in the *MYH*, an enzyme involved in the base excision repair pathway (BER). From these syndromes emerges a wide spectrum of different clinical phenotypes some of which are well characterised such as the Muir-Torre syndrome. The Muir-Torre syndrome is a variant form of HNPCC that associates tumors of the sebaceous gland with various visceral malignant diseases including gastrointestinal cancers and is characterised by microsatellite instability¹.

The pilomatricosis and colorectal adenomatosis (PCA) syndrome is an emerging new pediatric syndrome characterized by the early onset of colorectal adenomas associated with the presence of multiple pilomatricomas. Pilomatricomas are benign appendageal tumors with differentiation toward hair cells that usually manifest as a solitary, asymptomatic, firm nodule². Three cases of this syndrome have been reported. One case was described in a kindred affected by MYH-associated polyposis by Baglioni et al³. Recently, we reported two others unrelated patients presenting this syndrome (Jacob *et al.*, submitted). We first excluded a possible diagnosis of familial adenomatous polyposis (FAP) and Gardner syndrome by a negative APC truncation test. Our patients were also negative for germline mutations in other Wnt signalling proteins: *AXIN2* and *CTNNB1* (β -catenin). We also ruled out a MAP by the absence

of mutation in the *MYH* gene. We also tested the genes encoding the enzymes *OGG1* and *MTH1* of BER for germline mutations. We did not detect any mutation. Therefore, no constitutional mutation was identified in these patients.

Here, we performed somatic studies to better characterise the tumors involved in this syndrome. We first targeted the Wnt signalling pathway by examining the β -catenin mutations and expression in colorectal adenomas and pilomatricomas. Loss of heterozygosity (LOH) studies were performed to detect any somatic alteration of the *APC* gene. In order to investigate the mismatch repair pathway (MMR), microsatellite instability (MSI) studies were performed in the tumors of our patients.

MATERIALS AND METHODS

Subjects

Patient I. Multiple pilomatricomatosis was diagnosed in a 14-year-old boy. Ten lesions located on the arm, head and neck were surgically removed. He also has periorificial lentiginosis. The family history revealed that his father was affected by an inflammatory bowel disease and that his paternal grandfather was known to have intestinal polyps. Colonoscopy of the patient showed at least 10 polyps disseminated in the sigmoid colon, transverse colon and rectum. Polyps were endoscopically removed. Histologically, they corresponded to tubulous adenomas with mild dysplasia. Screening for Gardner syndrome associated abnormalities, including osteomas, fibromas, and retinal pigmented epithelium lesions, was negative. (Pour l'arbre généalogique, se référer à l'annexe IV, Figure 20)

Patient II. Patient II is a 9-year-old girl who was referred at 5 years of age for three pilomatricomas and hypertrichosis. Pilomatricomas located on her back and arms were surgically removed. Her father also had hypertrichosis but had no pilomatricomas. The father of the paternal grandmother died of colon cancer. Intestinal polyposis was observed in the paternal great uncles and great aunts. The patient underwent colonoscopic examination and two polyps were detected in the sigmoid colon. Polyps were removed endoscopically and were histologically diagnosed as tubulous adenomas with mild dysplasia. A screening for Gardner syndrome associated abnormalities, including osteomas, fibromas, and retinal

pigmented epithelium lesions, was negative. (Pour l'arbre généalogique, se référer à l'annexe IV, Figure 21)

Immunohistochemistry

Immunohistochemistry for β -catenin was performed by the Envision +/-horseradish peroxidase (Dako, Glostrup, Denmark) method with heat-induced antigen retrieval, as previously reported^{4, 5}. The mouse antihuman β -catenin monoclonal antibody (Catalog No. 19220, BD Transduction Laboratories, Lexington, KY, USA) was applied at a dilution of 1: 200. The immunostaining results for both cytoplasm and nucleus were evaluated by comparing the staining intensities of tumor cells and adjacent nontumor epithelial cells. Immunostaining was defined as positive when more than 10% of tumor cells stained more strongly than normal cells.

Laser Capture Microdissection and DNA Extraction

Adenomas from the 2 patients were identified morphologically on hematoxylin and eosin (H&E) stained slides. Paraffin embedded tissue sections of the adenomas were deparaffinized, dehydrated and stained with H&E. Laser capture microdissection (AutoPix, Arcturus Engineering, Mountain View, CA) was performed according to manufacturer's instructions. Microdissection was not performed on pilomatricomas since they were fixed with Bouin' reagent⁶. For all specimens, DNA was extracted in 10 ul of proteinase K extraction buffer (DNA Pico pure extraction kit, Catalog # KIT01Arcturus Engineering, Mountain View, CA) and incubated for 20 hours at 65°C, followed by 5 minutes incubation at 95°C to inactivate proteinase K (pour les

images, le protocole de l'amplification de l'ADN et les conditions de PCR, se référer à l'annexe III, tableaux VIII et IX à la fin du mémoire)

Loss of Heterozygosity Analyses

Matched normal and tumoral tissues from adenomas were amplified with polymorphic marker D5S346 which lies near the APC gene locus 5q21. The forward microsatellite primer was labelled with IRDye800 infrared dye and the reverse primer was labelled with IRDye700 infrared dye from LI-COR Biosciences. Polymerase Chain Reaction (PCR) amplification of the marker was performed in a 10 µL and consisted of 95°C for 5 minutes followed by 28 cycles of 95°C for 20 seconds, 55°C for 30 seconds, 72°C for 30 seconds, and a final extension at 72°C for 3 minutes. The PCR products were separated by electrophoresis on 6.5% polyacrylamide gel and detected by laser fluorescence IR 700 and 800 using an automated gene sequencer (LI-COR Biosciences). LOH was indicated by the absence or a greater than 50% reduction in intensity of an allele in adenoma compared to normal tissue. Cases were considered informative when DNA of the normal control showed heterozygous alleles. Cases displaying homozygosity in normal tissue were regarded uninformative.

Microsatellite instability studies

Microsatellite instability in matched normal and tumoral tissues was analysed by applying the reference marker panel for the evaluation of microsatellite instability in colorectal cancer (BAT25, BAT26, D2S123, D5S346 and D17S250)⁷ of the National

Cancer Institute/International Collaborative Group on HNPCC (NCI/ICG-HNPCC) using the same conditions as described for the detection of LOH (above). The microsatellites D9S289, D11S921, D11S1307, D11S1338 were also used to test for MSI in normal and tumoral tissue. MSI positivity was defined as the presence of altered or additional alleles in the tumour compared with the normal tissue. A tumor was considered MSI-high positive when 2 or more markers from the reference marker panel are unstable. Tumor showing size variations at a single microsatellite locus were defined MSI-low⁷.

Mutational analysis

For mutational analysis of exon 3 of β -catenin, DNA obtained for the laser capture microdissection was subjected to PCR with a previously described pair of primer encompassing the GSK-3 β -phosphorylation sites of β -catenin, 1f:5'-ATTTGATGGAGTTGGACATGGC-3' and 1r: 5'CCAGCTACTTGTCTTGAGTGAAGG-3'⁸. PCR was performed under the following conditions: 10 minutes at 94°C for initial denaturing, followed by 35 cycles at 94°C for 30 seconds, 55°C for 30 seconds, 72°C for 30 seconds and a final extension at 72°C for 7 minutes. The PCR products were purified using the Rapid PCR purification system (Marligen Biosciences, Ijamsville, Maryland, USA). Isolated PCR products were sequenced on a Beckman Coulter CEQ 2000XL DNA analysis system (Beckman Coulter, Fullerton, California, USA). Samples were sequenced on both sides (pour la séquence, se référer à l'annexe II à la fin du mémoire).

RESULTS

β -catenin studies

Immunohistochemistry was performed using a β -catenin antibody. In the colorectal adenomas, nuclear and cytoplasmic staining was present in the epithelial cells with mild dysplasia. Pilomatricomas also exhibited strong nuclear and cytoplasmic staining for β -catenin. Focal nuclear reactivity was noted in the basaloid cells (Figure 1). This increased reactivity for β -catenin in both the colorectal adenomas and pilomatricomas is evocative of a deregulation of the Wnt signaling pathway, which lead us to a sequencing analysis of exon 3 of β -catenin. In human cancers, most β -catenin alterations carry mutations in amino acid residues of the N-terminal segment corresponding to exon 3^{2, 9}. Sequencing β -catenin exon 3 in sense and antisense strands did not reveal any mutation. Pilomatricomas of both patients were not analyzed since they were fixed with Bouin's reagent.

APC Loss of Heterozygosity studies

DNA obtained from microdissected colorectal adenomas (Figure 3) was used to perform loss of heterozygosity studies on locus D5S346 flanking the *APC* gene. Matched normal and tumoral tissues were analyzed. No allelic deletion at the locus for *APC* gene on chromosome 5q was detected in both patients.

Microsatellite instability studies

Microsatellite analysis of one tumor specimen from patient 2 revealed a MSI-high profile, where the five markers of the reference panel showed additional bands compared to the corresponding normal tissue specimens. Moreover, the microsatellites markers D9S289, D11S921, D11S1307, D11S1338 were tested for MSI and also showed additional bands (Figure 2). Patient 1 showed normal band patterns in both the normal and tumoral tissues in the reference panel and in the microsatellites markers D9S289, D11S921, D11S1307, D11S1338.

DISCUSSION

The pilomatricomas and colorectal adenomatosis syndrome (PCA syndrome) was described recently in 2 unrelated patients without known germline mutations (Jacob *et al.*, submitted). We have identified microsatellite instability in one of our patient (patient I). We did not detect any genetic alteration in patient II, suggesting that another mechanism may underlie the PCA syndrome.

Deregulation of the Wnt pathway

We first tested both patients for a deregulation of the Wnt signalling pathway. In the two patients, immunohistochemistry showed a strong membranous and nuclear staining for β -catenin antibody in the adenomas and pilomatricomas. These results were expected since it was already demonstrated that the translocation of β -catenin to the nucleus plays a direct role in the pilomatricomas oncogenesis and contributes to the progression of the adenoma-carcinoma sequence^{2, 10, 11}. These results are therefore very suggestive of a deregulation of the Wnt signaling pathway.

We did not detect any somatic mutation of β -catenin exon 3 in the adenomas. However, this mutation is rare in adenomas and colorectal carcinomas¹². Pilomatricomas were not tested for mutation in exon 3 of β -catenin since they were fixed with Bouin's reagent. No LOH was detected in *APC* gene of both patients. This result confirms the initial exclusion of a Gardner syndrome. It seems that the

deregulation of the Wnt signaling pathway is not due to a mutation in the *APC* or β -catenin genes.

Genetic heterogeneity observed in PCA syndrome

The PCA syndrome was first observed by Baglioni *et al.* in two affected siblings born from consanguineous parents. A MYH associated polyposis (MAP) was diagnosed in the child, after the detection of a mutation in exon 13 of *MYH* gene³. Extracolonic features have been already described in patients affected by MAP but they remain not well documented yet. A small proportion of patients develop duodenal polyposis. One case of gastric cancer has also been reported^{13, 14}. Congenital hyperplasia of the retinal-pigment epithelium, melanomas, dental and dermoid cysts, and osteomas are other features that have been described¹³⁻¹⁶. *MYH* is a glycosylase involved in the Base Excision Repair Pathway that plays an important role in the repair of DNA mutations caused by reactive oxygen species generated during aerobic metabolism¹⁷. Oxidative damage converts guanine into 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxo-G) which mispairs with adenine, resulting in G:C \rightarrow T:A transversion mutations¹⁸. *MYH*, *OGG1* and *MTH1* function in consort to identify and repair 8-oxo-G incorporated into DNA. Interestingly, no germline mutations in *OGG1* and *MTH1* have been reported yet. However, loss of heterozygosity (LOH) in the *OGG1* locus have been detected in pulmonary tumors¹⁹. Somatic mutations have also been identified in kidney and lung tumors, after LOH studies^{20, 21}. No somatic mutation has been described in *MTH1*. In our previous report, our two patients were tested for germline mutations in *MYH*, *OGG1* and *MTH1* and we did not detect any mutation.

We observed microsatellite instability in one of the adenoma of patient I. This MSI underlies a defect in genes involved in the MMR. A defective MMR system leads to the inability of the repair machinery to correct base-base mismatches, small insertions and deletions which cause an increase in the overall genomic mutations rate²².

There is a high variability in the phenotype of the syndromes associated with a defect of the MMR genes. Mutations in the *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* and *PMS2* are classically described in a context of HNPCC (Lynch syndrome)²³⁻²⁷. Mutations in these genes are also described in a context of Turcot syndrome, Muir-Torre syndrome and neurofibromatosis1-hematologic malignancies syndrome. Interestingly, in young patients with homozygous or compound heterozygous for mutations in *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* and *PMS*, have been reported and mainly develop hematological malignancies, brain tumors and less frequently gastrointestinal tumors²⁸⁻³².

These syndromes also show genetic heterogeneity. A good example is the Turcot syndrome (TS), defined by the association of colorectal and central nervous tumors³³. Two major types of TS can be distinguished based on their clinical findings and molecular pathogenesis. TS can be first caused by *APC* mutations and is associated with childhood cerebellar medulloblastomas. TS can also be related to MMR gene mutations and CNS tumors are gliomas arising in both children and adults³⁴.

Muir-Torre syndrome is a cancer predisposing genodermatosis characterized by the occurrence of sebaceous skin tumors such as sebaceous adenomas, epitheliomas and keratocanthomas and internal malignancies, caused by mutations in genes of the MMR pathways such as *MSH2* and *MLH1*¹. Interestingly, a patient with Muir-Torre syndrome was reported to harbor a mutation in the *MYH* gene³⁵. This syndrome is a common phenotype of the BER and MMR systems. This can be explained by the fact that *MSH2* and *MSH6* enzymes from the MMR are also activated upon recognition of 8-oxoG. The MYH-mediated BER may co-operate with MMR in protecting against the mutagenic effects of 8-oxoG³⁶.

The digestive and cutaneous phenotype described in the PCA syndrome is similar to the one observed in the Muir-Torre syndrome. The PCA syndrome shows genetic heterogeneity and could be a phenotypic expression of a genetic anomaly in both the BER and the MMR systems. So far, we have not detected any mutations in the patient II who is also affected by the PCA syndrome. Interestingly, patient II has also hypertrichosis, a manifestation which has not been described in the two others patients. We believe that another genetic anomaly in the BER and MMR pathways would cause the PCA syndrome.

Our results demonstrated that the PCA syndrome is probably a new predisposition syndrome to colorectal cancer that shows genetic heterogeneity. The PCA syndrome is the phenotypic expression of two genetic alterations in the BER and the MMR

pathways. Other mutations in these pathways are expected to be found. On a clinical perspective, we recommend that patients affected by pilomatricomatosis to be tested for colorectal adenomas and microsatellite instability.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to acknowledge Canadian Dermatology Foundation (<http://www.cdf.ca>) for funding of this project. We wish to thank the Research Center of CHU Ste-Justine which provided grant support for this study and Dr. Émile Levy for his support. We are grateful to Dr. Daniel Sinnett for his continuous support and Dr. Benoît Panzini for stimulating discussions. Karine Jacob is supported by grants from the Research Center of CHU Ste-Justine, the Department of pathology of the CHU Sainte-Justine, and the Department of pathology and cellular biology of the Université de Montréal.

FIGURES

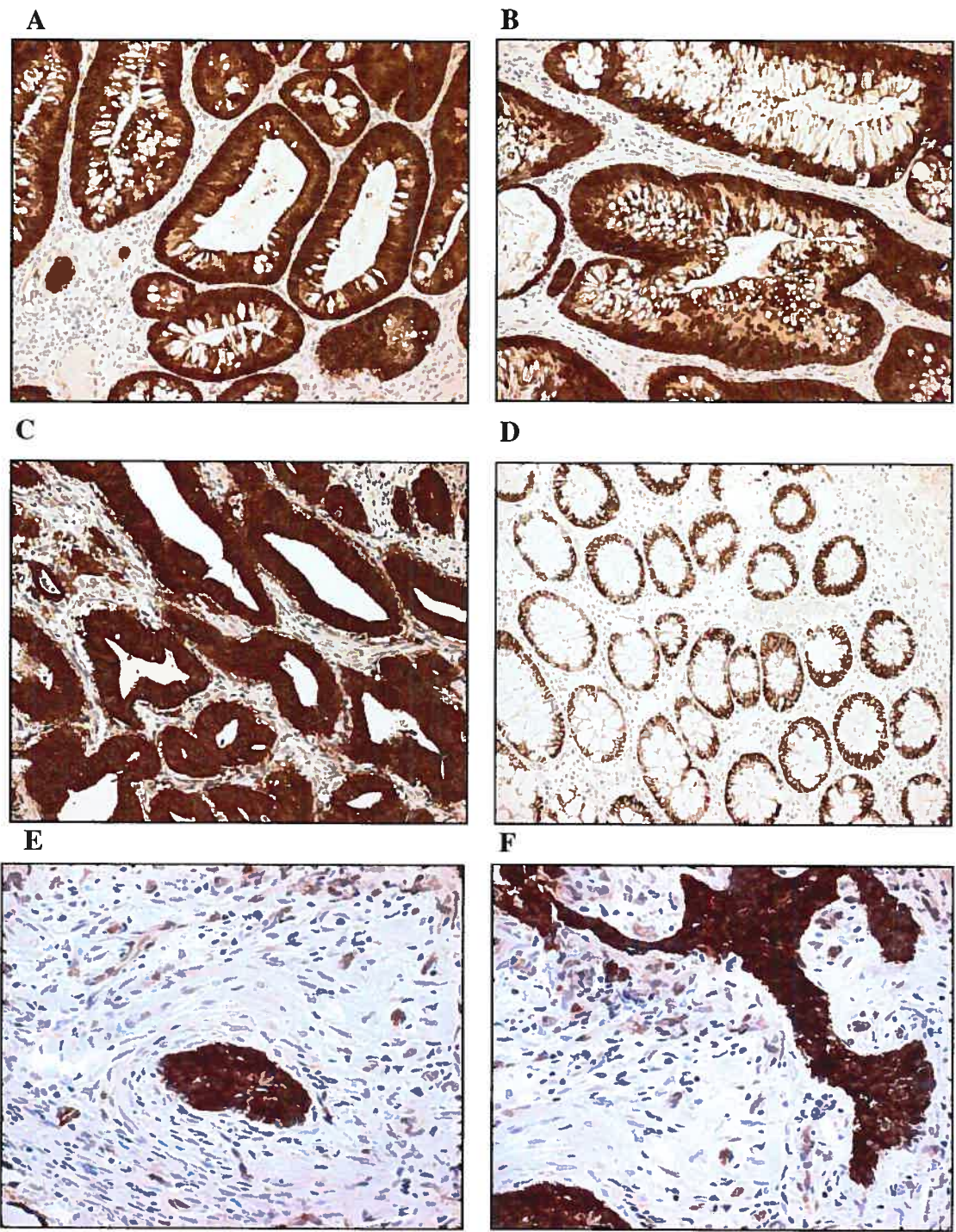


Figure 1: Immunohistochemistry using β -catenin antibody was performed on colorectal adenomas and pilomatricomas. Epithelial cells of colorectal adenomas show strong cytoplasmic, membranous and nuclear positivity for β -catenin antibody for patient I (A) and patient II (B). β -catenin antibody in colorectal cancer (C) and in a normal intestinal epithelium (D). Nuclear and cytoplasmic staining was present in the basaloid cells of the pilomatricomas for patient I (D) and patient II (E).




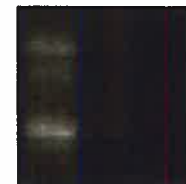

D9S289	D11S921	D11S1307	D11S1338	D5S346
				

Figure 2: Microsatellite instability studies. MSI was observed in patient 1. Normal and tumoral tissues were used. These markers showed additional bands in the tumoral (right) compared to the normal (left) tissues.



Figure 3: Laser capture microdissection was performed to capture epithelial cells of the colorectal adenomas.

REFERENCES

1. **Ponti G, Ponz de Leon M.** Muir-Torre syndrome. *Lancet Oncol* 2005;**6**:980-7.
2. **Chan EF, Gat U, McNiff JM, Fuchs E.** A common human skin tumour is caused by activating mutations in beta-catenin. *Nat Genet* 1999;**21**:410-3.
3. **Baglioni S, Melean G, Gensini F, Santucci M, Scatizzi M, Papi L, Genuardi M.** A kindred with MYH-associated polyposis and pilomatricomas. *Am J Med Genet A* 2005;**134**:212-4.
4. **Palacios J, Gamallo C.** Mutations in the beta-catenin gene (CTNNB1) in endometrioid ovarian carcinomas. *Cancer Res* 1998;**58**:1344-7.
5. **Gamallo C, Palacios J, Moreno G, Calvo de Mora J, Suarez A, Armas A.** beta-catenin expression pattern in stage I and II ovarian carcinomas : relationship with beta-catenin gene mutations, clinicopathological features, and clinical outcome. *Am J Pathol* 1999;**155**:527-36.
6. **Bonin S, Petrera F, Rosai J, Stanta G.** DNA and RNA obtained from Bouin's fixed tissues. *J Clin Pathol* 2005;**58**:313-6.
7. **Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, Sidransky D, Eshleman JR, Burt RW, Meltzer SJ, Rodriguez-Bigas MA, Fodde R, Ranzani GN, Srivastava S.** A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res* 1998;**58**:5248-57.

8. **Dogliani C, Piccinin S, Demontis S, Cangi MG, Pecciarini L, Chiarelli C, Armellin M, Vukosavljevic T, Boiocchi M, Maestro R.** Alterations of beta-catenin pathway in non-melanoma skin tumors: loss of alpha-ABC nuclear reactivity correlates with the presence of beta-catenin gene mutation. *Am J Pathol* 2003;**163**:2277-87.
9. **Morin PJ, Sparks AB, Korinek V, Barker N, Clevers H, Vogelstein B, Kinzler KW.** Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. *Science* 1997;**275**:1787-90.
10. **Kajino Y, Yamaguchi A, Hashimoto N, Matsuura A, Sato N, Kikuchi K.** beta-Catenin gene mutation in human hair follicle-related tumors. *Pathol Int* 2001;**51**:543-8.
11. **Kobayashi M, Honma T, Matsuda Y, Suzuki Y, Narisawa R, Ajioka Y, Asakura H.** Nuclear translocation of beta-catenin in colorectal cancer. *Br J Cancer* 2000;**82**:1689-93.
12. **Samowitz WS, Powers MD, Spirio LN, Nollet F, van Roy F, Slattery ML.** Beta-catenin mutations are more frequent in small colorectal adenomas than in larger adenomas and invasive carcinomas. *Cancer Res* 1999;**59**:1442-4.
13. **Sampson JR, Dolwani S, Jones S, Eccles D, Ellis A, Evans DG, Frayling I, Jordan S, Maher ER, Mak T, Maynard J, Pigatto F, Shaw J, Cheadle JP.** Autosomal recessive colorectal adenomatous polyposis due to inherited mutations of MYH. *Lancet* 2003;**362**:39-41.
14. **Sieber OM, Lipton L, Crabtree M, Heinimann K, Fidalgo P, Phillips RK, Bisgaard ML, Orntoft TF, Aaltonen LA, Hodgson SV, Thomas HJ,**

- Tomlinson IP.** Multiple colorectal adenomas, classic adenomatous polyposis, and germ-line mutations in MYH. *N Engl J Med* 2003;**348**:791-9.
15. **Gismondi V, Meta M, Bonelli L, Radice P, Sala P, Bertario L, Viel A, Fornasarig M, Arrigoni A, Gentile M, Ponz de Leon M, Anselmi L, Marenzi C, Bruzzi P, Varesco L.** Prevalence of the Y165C, G382D and 1395delGGA germline mutations of the MYH gene in Italian patients with adenomatous polyposis coli and colorectal adenomas. *Int J Cancer* 2004;**109**:680-4.
 16. **Enholm S, Hienonen T, Suomalainen A, Lipton L, Tomlinson I, Karja V, Eskelinen M, Mecklin JP, Karhu A, Jarvinen HJ, Aaltonen LA.** Proportion and phenotype of MYH-associated colorectal neoplasia in a population-based series of Finnish colorectal cancer patients. *Am J Pathol* 2003;**163**:827-32.
 17. **Lindahl T.** Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* 1993;**362**:709-15.
 18. **Nghiem Y, Cabrera M, Cupples CG, Miller JH.** The mutY gene: a mutator locus in Escherichia coli that generates G.C----T.A transversions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988;**85**:2709-13.
 19. **Kohno T, Shinmura K, Tosaka M, Tani M, Kim SR, Sugimura H, Nohmi T, Kasai H, Yokota J.** Genetic polymorphisms and alternative splicing of the hOGG1 gene, that is involved in the repair of 8-hydroxyguanine in damaged DNA. *Oncogene* 1998;**16**:3219-25.

20. **Audebert M, Chevillard S, Levalois C, Gyapay G, Vieillefond A, Klijanienko J, Vielh P, El Naggar AK, Oudard S, Boiteux S, Radicella JP.** Alterations of the DNA repair gene OGG1 in human clear cell carcinomas of the kidney. *Cancer Res* 2000;**60**:4740-4.
21. **Chevillard S, Radicella JP, Levalois C, Lebeau J, Poupon MF, Oudard S, Dutrillaux B, Boiteux S.** Mutations in OGG1, a gene involved in the repair of oxidative DNA damage, are found in human lung and kidney tumours. *Oncogene* 1998;**16**:3083-6.
22. **Brueckl WM, Jung A, Wein A, Brabletz T, Guenther K, Nusko G, Hahn EG.** Microsatellite instability in colorectal adenomas: relevance and clinical importance. *Int J Colorectal Dis* 2000;**15**:189-96.
23. **Leach FS, Nicolaides NC, Papadopoulos N, Liu B, Jen J, Parsons R, Peltomaki P, Sistonen P, Aaltonen LA, Nystrom-Lahti M, et al.** Mutations of a mutS homolog in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cell* 1993;**75**:1215-25.
24. **Nicolaides NC, Papadopoulos N, Liu B, Wei YF, Carter KC, Ruben SM, Rosen CA, Haseltine WA, Fleischmann RD, Fraser CM, et al.** Mutations of two PMS homologues in hereditary nonpolyposis colon cancer. *Nature* 1994;**371**:75-80.
25. **Papadopoulos N, Nicolaides NC, Wei YF, Ruben SM, Carter KC, Rosen CA, Haseltine WA, Fleischmann RD, Fraser CM, Adams MD, et al.** Mutation of a mutL homolog in hereditary colon cancer. *Science* 1994;**263**:1625-9.

26. **Kolodner RD, Tytell JD, Schmeits JL, Kane MF, Gupta RD, Weger J, Wahlberg S, Fox EA, Peel D, Ziogas A, Garber JE, Syngal S, Anton-Culver H, Li FP.** Germ-line msh6 mutations in colorectal cancer families. *Cancer Res* 1999;**59**:5068-74.
27. **Fishel R, Lescoe MK, Rao MR, Copeland NG, Jenkins NA, Garber J, Kane M, Kolodner R.** The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Cell* 1993;**75**:1027-38.
28. **Menko FH, Kaspers GL, Meijer GA, Claes K, van Hagen JM, Gille JJ.** A homozygous MSH6 mutation in a child with cafe-au-lait spots, oligodendroglioma and rectal cancer. *Fam Cancer* 2004;**3**:123-7.
29. **Wang Q, Montmain G, Ruano E, Upadhyaya M, Dudley S, Liskay RM, Thibodeau SN, Puisieux A.** Neurofibromatosis type 1 gene as a mutational target in a mismatch repair-deficient cell type. *Hum Genet* 2003;**112**:117-23.
30. **Whiteside D, McLeod R, Graham G, Steckley JL, Booth K, Somerville MJ, Andrew SE.** A homozygous germ-line mutation in the human MSH2 gene predisposes to hematological malignancy and multiple cafe-au-lait spots. *Cancer Res* 2002;**62**:359-62.
31. **Bougeard G, Charbonnier F, Moerman A, Martin C, Ruchoux MM, Drouot N, Frebourg T.** Early onset brain tumor and lymphoma in MSH2-deficient children. *Am J Hum Genet* 2003;**72**:213-6.
32. **Gallinger S, Aronson M, Shayan K, Ratcliffe EM, Gerstle JT, Parkin PC, Rothenmund H, Croitoru M, Baumann E, Durie PR, Weksberg R, Pollett A, Riddell RH, Ngan BY, Cutz E, Lagarde AE, Chan HS.** Gastrointestinal

- cancers and neurofibromatosis type 1 features in children with a germline homozygous MLH1 mutation. *Gastroenterology* 2004;**126**:576-85.
33. **Hamilton SR, Liu B, Parsons RE, Papadopoulos N, Jen J, Powell SM, Krush AJ, Berk T, Cohen Z, Tetu B, et al.** The molecular basis of Turcot's syndrome. *N Engl J Med* 1995;**332**:839-47.
 34. **Paraf F, Jothy S, Van Meir EG.** Brain tumor-polyposis syndrome: two genetic diseases? *J Clin Oncol* 1997;**15**:2744-58.
 35. **Ponti G, Ponz de Leon M, Maffei S, Pedroni M, Losi L, Di Gregorio C, Gismondi V, Scarselli A, Benatti P, Roncari B, Seidenari S, Pellacani G, Varotti C, Prete E, Varesco L, Roncucci L.** Attenuated familial adenomatous polyposis and Muir-Torre syndrome linked to compound biallelic constitutional MYH gene mutations. *Clin Genet* 2005;**68**:442-7.
 36. **Gu Y, Parker A, Wilson TM, Bai H, Chang DY, Lu AL.** Human MutY homolog, a DNA glycosylase involved in base excision repair, physically and functionally interacts with mismatch repair proteins human MutS homolog 2/human MutS homolog 6. *J Biol Chem* 2002;**277**:11135-42.

CHAPITRE VI : DISCUSSION

Plusieurs syndromes prédisposant au cancer colorectal ont été caractérisés et certains sont associés avec le développement de tumeurs digestives, hépatiques, cutanées, cérébrales et ovariennes. Les deux patients de cette étude présentent une association d'adénomatose colorectale et de pilomatricomatose. Nous croyons que cette association constitue une nouvelle entité clinique. À ce jour, seulement deux associations de ce type ont été rapportées dans la littérature. Dans ce projet, nous avons voulu identifier et caractériser les gènes impliqués dans cette association d'adénomatose colorectale et de pilomatrixomes. Plusieurs voies de signalisation contenant des gènes candidats ont été ciblées. Nous avons étudié les gènes impliqués dans le système BER, le système MMR et la voie de signalisation de Wnt. Des études constitutionnelles et somatiques ont été réalisées. Les résultats obtenus à l'issue de ces études nous ont permis de dégager plusieurs faits.

1. Vers une nouvelle entité clinique

Tout d'abord, une polypose colorectale a été diagnostiquée chez nos deux patients, ce qui évoquait la possibilité d'une polypose familiale adénomateuse. Les arbres généalogiques de nos deux patients ne nous permettent pas de confirmer le mode de transmission de leur maladie. Un test de troncation de la protéine APC a été effectué à l'hôpital Juif de Montréal à partir de l'ADN provenant du sang des patients. Aucune mutation dans le gène APC n'a été détectée par ce test. Le diagnostic de

FAP est ainsi très peu probable. Le test de troncation de la protéine APC est très fiable ayant démontré une efficacité de 90% (Powell, Petersen et al. 1993; van der Luijt, Khan et al. 1994; Ballhausen 2000). La présence d'une mutation non-troncante non-sens ne pourrait pas être détectée par test de troncation de la protéine APC. Cependant, ce type de mutations est minoritaire parmi toutes les mutations décrites dans le gène APC (Heinimann, Thompson et al. 2001).

Deux associations de pilomatrixomes multiples et de polypose colorectale ont été rapportées dans la littérature. La première association a été décrite dans le cadre d'un syndrome de Gardner par Pujol *et al.* (Pujol, Casanova et al. 1995). Dans cet article, le père et l'enfant présentaient plusieurs lésions cutanées correspondant histologiquement à des pilomatrixomes. À l'issue d'un examen complet, le père présentait plusieurs tumeurs associées au syndrome de Gardner. L'enfant ne présentait pas de polypose colorectale. Aucun test de troncation de la protéine APC n'a été effectué pour confirmer le diagnostic du père et de l'enfant. Cependant, dans de très rares cas, nous croyons que les pilomatrixomes pourraient être une tumeur associée au syndrome de Gardner.

Chez nos deux patients, nous avons exclu un syndrome de Gardner au vu de l'absence de mutations spécifiques entre les codons 1403 et 1578 du gène APC et du manque absence de tumeurs associées au syndrome de Gardner (de la Chapelle 2004). Cette association d'adénomatose colorectale et de pilomatricomatose représente donc une nouvelle entité clinique que nous avons désigné par l'acronyme

CAP (colorectal adenomatosis and pilomatricomatosis) et est différente du syndrome de Gardner.

2. Dérégulation de la voie de Wnt, sans identification d'altération génétique

Après analyse du gène APC, nous avons ciblé d'autres protéines de la voie de Wnt à la recherche de mutations constitutionnelles. Nous avons tout d'abord voulu exclure une mutation constitutionnelle dans le gène CTNNB1 de β -catenin considérant que chez l'humain, aucune mutation constitutionnelle dans le gène β -catenin n'a été rapportée à ce jour. Nous avons ainsi séquencé manuellement l'exon 3 du gène, puisqu'environ 30 à 100% des pilomatrixomes contiennent des mutations dans cet exon (Chan 2000; Moreno-Bueno, Gamallo et al. 2001). Aucune mutation germinale n'a été identifiée chez les deux patients. Nous croyons qu'une mutation constitutionnelle serait létale pour un embryon humain. En effet, selon les études réalisées chez la souris, les mutations homozygotes provenant d'un "knockout" dans les gènes β -catenin ou APC résultent en une létalité embryonnaire (Haegel, Larue et al. 1995; Moser, Shoemaker et al. 1995). En revanche, les souris mutantes ayant une délétion de l'exon 3 de β -catenin, seulement exprimée dans l'épithélium intestinal et colique, développent de nombreux adénomes, ce qui souligne l'importance de la protéine β -catenin dans la tumorigenèse colorectale (Harada, Tamai et al. 1999). De plus, les souris transgéniques qui expriment la protéine β -catenin avec une délétion de l'exon 3 sous le contrôle d'un promoteur épidermique, développent des pilomatrixomes et des tricofolliculomes (Gat, DasGupta et al. 1998). Ces études

démontrent bien le double rôle de la protéine β -catenin dans le développement des pilomatrixomes et dans le développement des adénomes colorectaux.

Par la suite, nous avons voulu détecter l'expression *in situ* de β -catenin dans les tissus tumoraux. Nous avons effectué une étude immunohistochimique en utilisant un anticorps dirigé contre la protéine β -catenin sur des coupes de pilomatrixomes et d'adénomes colorectaux. L'expression et la localisation de β -catenin peuvent être influencées par plusieurs facteurs. L'interprétation de cet anticorps reste encore mal définie. Il a été démontré que l'activation de la voie de Wnt provoque la translocation de β -catenin dans le noyau où la protéine induit la transcription de gènes cibles (Moon, Kohn et al. 2004). Cependant, l'expression de la protéine β -catenin ou la quantité totale de β -catenin dans le cytoplasme cellulaire est indépendante d'une mutation de β -catenin, puisqu'une mutation dans une autre protéine comme la protéine APC pourrait causer le même effet. Une augmentation des niveaux de β -catenin dans la cellule correspond donc à une dérégulation de la voie de Wnt. Selon certains auteurs, la localisation nucléaire de β -catenin peut corrélérer avec une mutation dans le gène s'il y a une nette augmentation des niveaux de β -catenin dans le noyau, comparé au niveau de β -catenin dans le cytoplasme. Cette mutation stabiliserait la protéine β -catenin ce qui entraînerait ainsi sa translocation dans le noyau (Moreno-Bueno, Gamallo et al. 2001; Park, Suh et al. 2001; Ridanpaa, Fodde et al. 2001).

Les adénomes et les pilomatrixomes de nos patients ont démontré une forte réactivité pour l'anticorps de β -catenin dans le cytoplasme et dans le noyau. Plus particulièrement, les cellules basaloïdes des pilomatrixomes de nos patients démontrent un marquage membranaire, cytoplasmique et nucléaire, ce qui suggère une dérégulation de la voie de Wnt. Ces résultats sont en accord avec la littérature révélant que la translocation de β -catenin dans le noyau joue rôle direct dans l'oncogenèse des pilomatrixomes (Chan, Gat et al. 1999; Kajino, Yamaguchi et al. 2001; Moreno-Bueno, Gamallo et al. 2001).

Comparée aux contrôles positifs et négatifs, la protéine β -catenin est surexprimée dans le cytoplasme et dans le noyau des cellules épithéliales des adénomes, ce qui est évocateur d'une dérégulation de la voie de Wnt. Il a déjà été démontré que dans les adénomes colorectaux, l'accumulation de β -catenin et surtout sa translocation dans le noyau, est associée avec la progression de la séquence adénome-carcinome (Kobayashi, Honma et al. 2000).

Pour mieux comprendre la surexpression de l'anticorps de β -catenin dans les adénomes, nous avons recherché dans ces lésions des mutations dans le gène β -catenin. Les cellules épithéliales dysplasiques des adénomes colorectaux ont été isolées par la technique de microdissection au laser et ensuite, l'exon 3 du gène β -catenin a été séquencé de façon automatique. Cet exon couvre la grande majorité de toutes les mutations décrites dans β -catenin (Morin, Sparks et al. 1997; Chan, Gat et al. 1999). Nous n'avons retrouvé aucune mutation chez nos deux patients. Les

mutations de β -catenin sont peu communes dans les adénomes et les carcinomes colorectaux (Samowitz, Powers et al. 1999). Nous n'avons pu rechercher des mutations dans les pilomatrixomes puisqu'ils sont fixés au Bouin, un agent chimique qui dégrade l'ADN (Bonin, Petrera et al. 2005).

Ces résultats d'immunohistochimie et de séquençage automatique de la protéine β -catenin suggèrent que la voie de Wnt est dérégulée et qu'une mutation dans une autre protéine de cette voie pourrait causer une augmentation des niveaux de β -catenin dans le cytoplasme et dans le noyau de la cellule, ce qui favoriserait la prolifération cellulaire et l'oncogenèse.

Un autre élément clé de la voie de Wnt, responsable potentiel de de l'association de pilomatrixomes multiples et de polypose colorectale, était la protéine AXIN2. Cette protéine est mutée dans environ 25% des carcinomes colorectaux avec instabilité microsatellite (Liu, Dong et al. 2000). Les mutations ont toutes été retrouvées dans l'exon 7 de la protéine. De plus, dans une famille finlandaise atteinte d'oligodontie et de cancer colorectal, une mutation a été détectée dans l'exon 7 du gène AXIN2 (Lammi, Arte et al. 2004). Cette dernière famille était particulièrement intéressante puisqu'elle associait un défaut dans le développement osseux des dents et une polypose colorectale. Les pilomatrixomes sont des tumeurs bénignes qui se calcifient en maturant et forment une structure qui rappelle la structure dentaire. Nos deux patients présentaient ainsi une association cliniquement semblable à la famille finlandaise. Nous avons testé l'exon 7 du gène AXIN2 et nous n'avons détecté aucune mutation. Une nouvelle mutation ne pouvant être exclue, il serait donc

intéressant de séquencer les autres exons de ce gène. Des mutations dans d'autres protéines impliquées dans cette voie pourraient également causer une telle association. Par exemple, AXIN1 serait un gène intéressant puisque des mutations somatiques AXIN1 ont déjà été détectées dans le cancer colorectal (Jin, Shao et al. 2003).

3. Hétérogénéité du syndrome CAP

3.a) Mutation dans MYH

Une deuxième association de polypose colorectale et de pilomatricomatose a récemment été décrite chez deux enfants issus de parents consanguins (Baglioni, Melean et al. 2005). Dans cette famille, des mutations ont été retrouvées dans l'exon 13 du gène de MYH, une enzyme du système de réparation des bases par l'excision (BER).

Nous avons donc séquencé tous les exons ainsi que les régions introniques flanquantes du gène de MYH. Nous n'avons détecté aucune mutation constitutionnelle chez nos deux patients. Nos deux patients ne partagent donc pas les anomalies génétiques décrites par Baglioni *et al.*

Nous avons par la suite recherché des mutations dans tous les exons codants et les régions introniques flanquantes des gènes OGG1 et MTH1, deux autres glycosylases aussi impliquées dans le système BER. À ce jour, aucune mutation germinale dans

les gènes de OGG1 et MTH1 n'a été rapportée dans la littérature. Aucune mutation constitutionnelle dans ces gènes n'a été retrouvée chez nos deux patients.

3.b) Défaillance dans le système de réparation des mésappariements de l'ADN

Nous avons observé dans un adénome colorectal d'un de nos deux patients une instabilité des microsatellites. Celle-ci est due à une défaillance d'un gène dans le système de réparation des mésappariements. Nous avons entrepris des études immunohistochimiques pour évaluer l'expression des protéines du système MMR. Une absence d'expression des protéines du système MMR par immunohistochimie est évocatrice d'une mutation dans un gène du système MMR. Des recherches de mutations germinales dans les gènes cibles seront alors effectuées. Le syndrome CAP pourrait être une expression phénotypique d'une anomalie dans le système MMR au même titre que le syndrome de Lynch (HNPCC), le syndrome de Muir-Torre et le syndrome de Turcot associé à un défaut dans le système MMR.

Certains de ces syndromes démontrent également une hétérogénéité génétique. Le syndrome de Turcot est un bon exemple. Ce syndrome est caractérisé par l'association de tumeurs colorectales et de tumeurs du système nerveux central. Il existe deux types de syndromes de Turcot basés sur des manifestations cliniques et des mutations différentes. Le premier est causé par des mutations germinales dans le gène APC et est associé avec des médulloblastomes cérébraux infantiles. Le deuxième est causé par des mutations dans les gènes du système MMR et les tumeurs

sont des gliomes retrouvés chez l'enfant et chez l'adulte (Hamilton, Liu et al. 1995; Paraf, Jothy et al. 1997).

Dans le syndrome de Muir-Torre, des adénomes sébacés sont associés avec le développement de tumeurs. Généralement, ce syndrome est causé par des mutations dans les gènes MSH2 et HML1 (Ponti and Ponz de Leon 2005). Cependant, une mutation dans le gène de MYH a aussi été rapportée chez un patient atteint de ce syndrome (Ponti, Ponz de Leon et al. 2005). Ce syndrome est donc un phénotype commun aux anomalies des systèmes BER et MMR. Ce fait peut s'expliquer par la coopération du système BER avec le système MMR pour protéger la cellule contre les effets mutagéniques du 8-oxo-G (Gu, Parker et al. 2002).

Le phénotype cutané et digestif du syndrome CAP s'inscrit dans le même cadre que le syndrome de Muir-Torre. Comme lui, le syndrome CAP est génétiquement hétérogène et peut être causé par des mutations dans les gènes du système MMR ou par des mutations dans les gènes du système BER (MYH).

3.c) Autres anomalies

À ce jour, nous n'avons détecté aucune mutation chez un de nos deux patients atteints du syndrome CAP. Nous croyons qu'une autre altération génétique dans les systèmes de MMR et BER serait également à l'origine du syndrome CAP.

4. Conclusions et perspectives futures

Le syndrome CAP est probablement un nouveau syndrome de prédisposition au cancer colorectal, génétiquement hétérogène. Il serait intéressant de poursuivre les études somatiques chez nos deux patients en recherchant des pertes d'allèles dans les gènes du système BER : MYH, OGG1 et MTH1. À ce jour, des pertes d'allèles dans le gène de MYH ont seulement été recherchées dans les cancers colorectaux sporadiques (Kambara, Whitehall et al. 2004; Johnson, Lipton et al. 2005). De plus, certaines tumeurs pulmonaires et rénales ont démontré des pertes d'allèles dans le gène de OGG1 (Chevillard, Radicella et al. 1998; Kohno, Shinmura et al. 1998; Audebert, Chevillard et al. 2000). D'autres gènes candidats pourraient aussi être étudiés tels que KRAS et TP53. De façon complémentaire, nous voulons mieux caractériser le génome des tumeurs de nos patients en réalisant des études de génotypage tumoral par micropuces à polymorphisme d'un seul nucléotide (Single Nucleotide Polymorphism, SNP ou SNP arrays) (Zheng, Peng et al. 2005; Fan, Chee et al. 2006).

Pour notre étude, nous disposons de deux familles recrutées par le CHU Sainte-Justine. Elles représentent les deux seules familles comportant une association de pilomatrixomes et d'adénomes colorectaux répertoriées durant les 20 dernières années au CHU Sainte-Justine. Seule une autre famille a été décrite dans la littérature (Baglioni, Melean et al. 2005). Nous espérons que la publication de l'article encouragera le recrutement d'autres familles dans le monde entier.

Des analyses de liaison seront effectuées lorsqu'un collectif suffisant de patients sera réuni. Ces analyses permettront peut-être de localiser le gène ou les gènes responsables de cette association.

Sur le plan clinique, nos résultats suggèrent que les patients atteints de pilomatricomatose devraient faire l'objet d'une recherche d'adénomes colorectaux et d'une instabilité des microsatellites. À l'instar de ce qui précède, nous recommandons également que chez les patients présentant des adénomes colorectaux, des pilomatrixomes soient recherchés soit comme antécédents soit comme lésions actuelles, ce qui pourrait évoquer un syndrome CAP.

RÉFÉRENCES

- Al-Tassan, N., N. H. Chmiel, et al. (2002). "Inherited variants of MYH associated with somatic G:C-->T:A mutations in colorectal tumors." Nat Genet **30**(2): 227-32.
- Audebert, M., S. Chevillard, et al. (2000). "Alterations of the DNA repair gene OGG1 in human clear cell carcinomas of the kidney." Cancer Res **60**(17): 4740-4.
- Baglioni, S., G. Melean, et al. (2005). "A kindred with MYH-associated polyposis and pilomatricomas." Am J Med Genet A **134**(2): 212-4.
- Ballhausen, W. G. (2000). "Genetic testing for familial adenomatous polyposis." Ann N Y Acad Sci **910**: 36-47; discussion 47-9.
- Barzilai, A. and K. Yamamoto (2004). "DNA damage responses to oxidative stress." DNA Repair (Amst) **3**(8-9): 1109-15.
- Berx, G., A. M. Cleton-Jansen, et al. (1995). "E-cadherin is a tumour/invasion suppressor gene mutated in human lobular breast cancers." Embo J **14**(24): 6107-15.
- Boland, C. R. and F. J. Troncale (1984). "Familial colonic cancer without antecedent polyposis." Ann Intern Med **100**(5): 700-1.
- Bonin, S., F. Petrera, et al. (2005). "DNA and RNA obtained from Bouin's fixed tissues." J Clin Pathol **58**(3): 313-6.

- Brueckl, W. M., A. Jung, et al. (2000). "Microsatellite instability in colorectal adenomas: relevance and clinical importance." Int J Colorectal Dis **15**(4): 189-96.
- Cambiaghi, S., E. Ermacora, et al. (1994). "Multiple pilomatricomas in Rubinstein-Taybi syndrome: a case report." Pediatr Dermatol **11**(1): 21-5.
- Cavenee, W. K., T. P. Dryja, et al. (1983). "Expression of recessive alleles by chromosomal mechanisms in retinoblastoma." Nature **305**(5937): 779-84.
- Chan, E. F. (2000). "Pilomatricomas contain activating mutations in beta-catenin." J Am Acad Dermatol **43**(4): 701-2.
- Chan, E. F., U. Gat, et al. (1999). "A common human skin tumour is caused by activating mutations in beta-catenin." Nat Genet **21**(4): 410-3.
- Cheadle, J. P. and J. R. Sampson (2003). "Exposing the MYtH about base excision repair and human inherited disease." Hum Mol Genet **12 Spec No 2**: R159-65.
- Cheng, L. and M. D. Lai (2003). "Aberrant crypt foci as microscopic precursors of colorectal cancer." World J Gastroenterol **9**(12): 2642-9.
- Chevillard, S., J. P. Radicella, et al. (1998). "Mutations in OGG1, a gene involved in the repair of oxidative DNA damage, are found in human lung and kidney tumours." Oncogene **16**(23): 3083-6.
- Cohen, M. M., Jr. (2003). "Molecular dimensions of gastrointestinal tumors: some thoughts for digestion." Am J Med Genet A **122**(4): 303-14.
- Colucci, P. M., S. H. Yale, et al. (2003). "Colorectal polyps." Clin Med Res **1**(3): 261-2.

- de la Chapelle, A. (2004). "Genetic predisposition to colorectal cancer." Nat Rev Cancer **4**(10): 769-80.
- Dib, C., S. Faure, et al. (1996). "A comprehensive genetic map of the human genome based on 5,264 microsatellites." Nature **380**(6570): 152-4.
- Doucas, H., G. Garcea, et al. (2005). "Changes in the Wnt signalling pathway in gastrointestinal cancers and their prognostic significance." Eur J Cancer **41**(3): 365-79.
- Enholm, S., T. Hienonen, et al. (2003). "Proportion and phenotype of MYH-associated colorectal neoplasia in a population-based series of Finnish colorectal cancer patients." Am J Pathol **163**(3): 827-32.
- Fan, J. B., M. S. Chee, et al. (2006). "Highly parallel genomic assays." Nat Rev Genet **7**(8): 632-44.
- Fearon, E. R. and B. Vogelstein (1990). "A genetic model for colorectal tumorigenesis." Cell **61**(5): 759-67.
- Fishel, R., M. K. Lescoe, et al. (1993). "The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer." Cell **75**(5): 1027-38.
- Fodde, R., R. Smits, et al. (2001). "APC, signal transduction and genetic instability in colorectal cancer." Nat Rev Cancer **1**(1): 55-67.
- Galiatsatos, P. and W. D. Foulkes (2006). "Familial adenomatous polyposis." Am J Gastroenterol **101**(2): 385-98.

- Gardner, E. J. (1962). "Follow-up study of a family group exhibiting dominant inheritance for a syndrome including intestinal polyps, osteomas, fibromas and epidermal cysts." Am J Hum Genet **14**: 376-90.
- Gat, U., R. DasGupta, et al. (1998). "De Novo hair follicle morphogenesis and hair tumors in mice expressing a truncated beta-catenin in skin." Cell **95**(5): 605-14.
- Geh, J. L. and A. L. Moss (1999). "Multiple pilomatrixomata and myotonic dystrophy: a familial association." Br J Plast Surg **52**(2): 143-5.
- Geiser, J. D. (1960). "[The familial form of epithelioma (calcifying) of Malherbe.]." Dermatologica **120**: 361-5.
- Gismondi, V., M. Meta, et al. (2004). "Prevalence of the Y165C, G382D and 1395delGGA germline mutations of the MYH gene in Italian patients with adenomatous polyposis coli and colorectal adenomas." Int J Cancer **109**(5): 680-4.
- Goldstein, N. S. (2006). "Serrated pathway and APC (conventional)-type colorectal polyps: molecular-morphologic correlations, genetic pathways, and implications for classification." Am J Clin Pathol **125**(1): 146-53.
- Gong, Y., R. B. Slee, et al. (2001). "LDL receptor-related protein 5 (LRP5) affects bone accrual and eye development." Cell **107**(4): 513-23.
- Groden, J., A. Thliveris, et al. (1991). "Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene." Cell **66**(3): 589-600.
- Gu, Y., A. Parker, et al. (2002). "Human MutY homolog, a DNA glycosylase involved in base excision repair, physically and functionally interacts with

mismatch repair proteins human MutS homolog 2/human MutS homolog 6." J Biol Chem **277**(13): 11135-42.

Guilford, P., J. Hopkins, et al. (1998). "E-cadherin germline mutations in familial gastric cancer." Nature **392**(6674): 402-5.

Haegel, H., L. Larue, et al. (1995). "Lack of beta-catenin affects mouse development at gastrulation." Development **121**(11): 3529-37.

Hamilton, S. R., B. Liu, et al. (1995). "The molecular basis of Turcot's syndrome." N Engl J Med **332**(13): 839-47.

Hampel, H., W. L. Frankel, et al. (2005). "Screening for the Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer)." N Engl J Med **352**(18): 1851-60.

Harada, N., Y. Tamai, et al. (1999). "Intestinal polyposis in mice with a dominant stable mutation of the beta-catenin gene." Embo J **18**(21): 5931-42.

Hassanein, A. M., S. M. Glanz, et al. (2003). "beta-Catenin is expressed aberrantly in tumors expressing shadow cells. Pilomatricoma, craniopharyngioma, and calcifying odontogenic cyst." Am J Clin Pathol **120**(5): 732-6.

Heinimann, K., A. Thompson, et al. (2001). "Nontruncating APC germ-line mutations and mismatch repair deficiency play a minor role in APC mutation-negative polyposis." Cancer Res **61**(20): 7616-22.

Ilyas, M., I. P. Tomlinson, et al. (1997). "Allele loss, replication errors and loss of expression of E-cadherin in colorectal cancers." Gut **40**(5): 654-9.

Jemal, A., T. Murray, et al. (2005). "Cancer statistics, 2005." CA Cancer J Clin **55**(1): 10-30.

- Jin, L. H., Q. J. Shao, et al. (2003). "Detection of point mutations of the Axin1 gene in colorectal cancers." Int J Cancer **107**(5): 696-9.
- Jiricny, J. (2006). "The multifaceted mismatch-repair system." Nat Rev Mol Cell Biol **7**(5): 335-46.
- Johnson, V., L. R. Lipton, et al. (2005). "Analysis of somatic molecular changes, clinicopathological features, family history, and germline mutations in colorectal cancer families: evidence for efficient diagnosis of HNPCC and for the existence of distinct groups of non-HNPCC families." J Med Genet **42**(10): 756-62.
- Kajino, Y., A. Yamaguchi, et al. (2001). "beta-Catenin gene mutation in human hair follicle-related tumors." Pathol Int **51**(7): 543-8.
- Kambara, T., V. L. Whitehall, et al. (2004). "Role of inherited defects of MYH in the development of sporadic colorectal cancer." Genes Chromosomes Cancer **40**(1): 1-9.
- Karim, R., G. Tse, et al. (2004). "The significance of the Wnt pathway in the pathology of human cancers." Pathology **36**(2): 120-8.
- Karpuzoglu, T., G. O. Elpek, et al. (2003). "Multiple familial pilomatrixomas." J Eur Acad Dermatol Venereol **17**(3): 358-9.
- Kim, C. J., Y. G. Cho, et al. (2004). "Genetic alterations of the MYH gene in gastric cancer." Oncogene **23**(40): 6820-2.
- Kim, I. J., J. L. Ku, et al. (2004). "Mutational analysis of OGG1, MYH, MTH1 in FAP, HNPCC and sporadic colorectal cancer patients: R154H OGG1

polymorphism is associated with sporadic colorectal cancer patients." Hum Genet **115**(6): 498-503.

Kinzler, K. W., M. C. Nilbert, et al. (1991). "Identification of FAP locus genes from chromosome 5q21." Science **253**(5020): 661-5.

Kinzler, K. W. and B. Vogelstein (1996). "Lessons from hereditary colorectal cancer." Cell **87**(2): 159-70.

Kobayashi, M., T. Honma, et al. (2000). "Nuclear translocation of beta-catenin in colorectal cancer." Br J Cancer **82**(10): 1689-93.

Kohno, T., K. Shinmura, et al. (1998). "Genetic polymorphisms and alternative splicing of the hOGG1 gene, that is involved in the repair of 8-hydroxyguanine in damaged DNA." Oncogene **16**(25): 3219-25.

Kolodner, R. D., J. D. Tytell, et al. (1999). "Germ-line msh6 mutations in colorectal cancer families." Cancer Res **59**(20): 5068-74.

Kunkel, T. A. and D. A. Erie (2005). "DNA mismatch repair." Annu Rev Biochem **74**: 681-710.

Lammi, L., S. Arte, et al. (2004). "Mutations in AXIN2 cause familial tooth agenesis and predispose to colorectal cancer." Am J Hum Genet **74**(5): 1043-50.

Lazar, A. J., E. Calonje, et al. (2005). "Pilomatrix carcinomas contain mutations in CTNNB1, the gene encoding beta-catenin." J Cutan Pathol **32**(2): 148-57.

Leach, F. S., N. C. Nicolaides, et al. (1993). "Mutations of a mutS homolog in hereditary nonpolyposis colorectal cancer." Cell **75**(6): 1215-25.

- Liu, W., X. Dong, et al. (2000). "Mutations in AXIN2 cause colorectal cancer with defective mismatch repair by activating beta-catenin/TCF signalling." Nat Genet **26**(2): 146-7.
- Lustig, B. and J. Behrens (2003). "The Wnt signaling pathway and its role in tumor development." J Cancer Res Clin Oncol **129**(4): 199-221.
- Lynch, H. T. and A. de la Chapelle (2003). "Hereditary colorectal cancer." N Engl J Med **348**(10): 919-32.
- Matsuura, H., A. Hatamochi, et al. (2002). "Multiple pilomatricoma in trisomy 9." Dermatology **204**(1): 82-3.
- Mitra, S., I. Boldogh, et al. (2001). "Complexities of the DNA base excision repair pathway for repair of oxidative DNA damage." Environ Mol Mutagen **38**(2-3): 180-90.
- Moon, R. T., A. D. Kohn, et al. (2004). "WNT and beta-catenin signalling: diseases and therapies." Nat Rev Genet **5**(9): 691-701.
- Moreno-Bueno, G., C. Gamallo, et al. (2001). "beta-catenin expression in pilomatrixomas. Relationship with beta-catenin gene mutations and comparison with beta-catenin expression in normal hair follicles." Br J Dermatol **145**(4): 576-81.
- Morin, P. J., A. B. Sparks, et al. (1997). "Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC." Science **275**(5307): 1787-90.

- Moser, A. R., A. R. Shoemaker, et al. (1995). "Homozygosity for the Min allele of Apc results in disruption of mouse development prior to gastrulation." Dev Dyn **203**(4): 422-33.
- Nicolaides, N. C., N. Papadopoulos, et al. (1994). "Mutations of two PMS homologues in hereditary nonpolyposis colon cancer." Nature **371**(6492): 75-80.
- Nishisho, I., Y. Nakamura, et al. (1991). "Mutations of chromosome 5q21 genes in FAP and colorectal cancer patients." Science **253**(5020): 665-9.
- Papadopoulos, N., N. C. Nicolaides, et al. (1994). "Mutation of a mutL homolog in hereditary colon cancer." Science **263**(5153): 1625-9.
- Paraf, F., S. Jothy, et al. (1997). "Brain tumor-polyposis syndrome: two genetic diseases?" J Clin Oncol **15**(7): 2744-58.
- Park, S. W., K. S. Suh, et al. (2001). "beta-Catenin expression in the transitional cell zone of pilomatricoma." Br J Dermatol **145**(4): 624-9.
- Peltomaki, P., R. A. Lothe, et al. (1993). "Microsatellite instability is associated with tumors that characterize the hereditary non-polyposis colorectal carcinoma syndrome." Cancer Res **53**(24): 5853-5.
- Pielop, J. A. and D. Metry (2005). "Multiple pilomatricomas in association with spina bifida." Pediatr Dermatol **22**(2): 178-9.
- Ponti, G. and M. Ponz de Leon (2005). "Muir-Torre syndrome." Lancet Oncol **6**(12): 980-7.

- Ponti, G., M. Ponz de Leon, et al. (2005). "Attenuated familial adenomatous polyposis and Muir-Torre syndrome linked to compound biallelic constitutional MYH gene mutations." Clin Genet **68**(5): 442-7.
- Powell, S. M., G. M. Petersen, et al. (1993). "Molecular diagnosis of familial adenomatous polyposis." N Engl J Med **329**(27): 1982-7.
- Powell, S. M., N. Zilz, et al. (1992). "APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis." Nature **359**(6392): 235-7.
- Pujol, R. M., J. M. Casanova, et al. (1995). "Multiple familial pilomatricomas: a cutaneous marker for Gardner syndrome?" Pediatr Dermatol **12**(4): 331-5.
- Richards, F. M., S. A. McKee, et al. (1999). "Germline E-cadherin gene (CDH1) mutations predispose to familial gastric cancer and colorectal cancer." Hum Mol Genet **8**(4): 607-10.
- Ridanpaa, M., R. Fodde, et al. (2001). "Dynamic expression and nuclear accumulation of beta-catenin during the development of hair follicle-derived structures." Mech Dev **109**(2): 173-81.
- Risinger, J. I., A. Berchuck, et al. (1994). "Mutations of the E-cadherin gene in human gynecologic cancers." Nat Genet **7**(1): 98-102.
- Rowley, P. T. (2005). "Inherited susceptibility to colorectal cancer." Annu Rev Med **56**: 539-54.
- Samowitz, W. S., M. D. Powers, et al. (1999). "Beta-catenin mutations are more frequent in small colorectal adenomas than in larger adenomas and invasive carcinomas." Cancer Res **59**(7): 1442-4.

- Sampson, J. R., S. Dolwani, et al. (2003). "Autosomal recessive colorectal adenomatous polyposis due to inherited mutations of MYH." Lancet **362**(9377): 39-41.
- Sampson, J. R., S. Jones, et al. (2005). "MutYH (MYH) and colorectal cancer." Biochem Soc Trans **33**(Pt 4): 679-83.
- Satoh, S., Y. Daigo, et al. (2000). "AXIN1 mutations in hepatocellular carcinomas, and growth suppression in cancer cells by virus-mediated transfer of AXIN1." Nat Genet **24**(3): 245-50.
- Sieber, O. M., L. Lipton, et al. (2003). "Multiple colorectal adenomas, classic adenomatous polyposis, and germ-line mutations in MYH." N Engl J Med **348**(9): 791-9.
- Toomes, C., H. M. Bottomley, et al. (2004). "Mutations in LRP5 or FZD4 underlie the common familial exudative vitreoretinopathy locus on chromosome 11q." Am J Hum Genet **74**(4): 721-30.
- Umar, A., J. I. Risinger, et al. (2004). "Testing guidelines for hereditary non-polyposis colorectal cancer." Nat Rev Cancer **4**(2): 153-8.
- van der Luijt, R., P. M. Khan, et al. (1994). "Rapid detection of translation-terminating mutations at the adenomatous polyposis coli (APC) gene by direct protein truncation test." Genomics **20**(1): 1-4.
- Van Wesenbeeck, L., E. Cleiren, et al. (2003). "Six novel missense mutations in the LDL receptor-related protein 5 (LRP5) gene in different conditions with an increased bone density." Am J Hum Genet **72**(3): 763-71.

- Vasen, H. F., J. P. Mecklin, et al. (1991). "The International Collaborative Group on Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer (ICG-HNPCC)." Dis Colon Rectum **34**(5): 424-5.
- Vogelstein, B. and K. W. Kinzler (1993). "The multistep nature of cancer." Trends Genet **9**(4): 138-41.
- Weitz, J., M. Koch, et al. (2005). "Colorectal cancer." Lancet **365**(9454): 153-65.
- Zheng, H. T., Z. H. Peng, et al. (2005). "Loss of heterozygosity analyzed by single nucleotide polymorphism array in cancer." World J Gastroenterol **11**(43): 6740-4.

ANNEXE I

Liste des amorces et conditions utilisées pour l'amplification de l'ADN génomique pour le séquençage direct.

Tableau II : *Amorces β -catenin et AXIN2*

Ex on	Nom de l'amorce	Séquence (5'-3')	bp	T (°C)
3	bcatenin2.fwd.exon3, b-catenin2.rev.exon3,	ATTTGATGGAGTTGGACATGGC CCAGCTACTTGTCTTGAGTGAAGG	233	55
7	axin2.fwd.exon7, axin2.rev.exon7,	TTCCAGTTCTTCTAACCCAGTTTC, TTGAGACCCAGGCAGAAAGAG,	398	59

Tableau III : Amorces du gène MYH

Exon	Nom de l'amorce	Séquence (5'-3')	bp	T (°C)
1	myh.exon1.fwd, myh.exon1.rev,	GAAGCTGCGGGAGCTGAAA ATCCCCGACTGCCTGAACC	133	60
2	myh.exon2.fwd, myh.exon2.rev,	CTGCATTTGGCTGGGTCTTT, CGCACCTGGCCCTTAGTAAG,	263	54
3	myh.exon3.fwd, myh.exon3.rev,	AGCCTGTGCAGGGATGATTG, CAACCCAGATGAGGAGTTAGG,	272	57
4	myh.exon4.fwd, myh.exon4.rev,	CTCATCTGGGGTTGCATTGA, GGGTGGCATGAGGACACTG,	167	57
5	myh.exon5.fwd, myh.exon5.rev,	GGGCAGGTCAGCAGTGTC, TACACCCACCCCAAAGTAGA,	189	57
6	myh.exon6.fwd, myh.exon6.rev,	TACTTTGGGGTGGGTGTAGA, AAGAGATCACCCGTCAGTCC,	185	54
7	myh.exon7.fwd, myh.exon7.rev,	GGGACTGACGGGTGATCTCT, TTGGAGTGCAAGACTCAAGATT,	186	54
8	myh.exon8.fwd, myh.exon8.rev,	CCAGGAGTCTTGGGTGTCTT, AGAGGGGCCAAAGAGTTAGC,	240	57
9	myh.exon9.fwd, myh.exon9.rev,	AACTCTTTGGCCCCTCTGTG, GAAGGGAACACTGCTGTGAAG,	196	57
10	myh.exon10.fwd, myh.exon10.rev,	GTGCTTCAGGGGTGTCTGC, TGTCATAGGGCAGAGTCACTCC,	262	57
11	myh.exon11.fwd, myh.exon11.rev,	TAAGGAGTGACTCTGCCCTATG, GCCAAGAGGGGCTTTAGG,	248	54
12	myh.exon12.fwd, myh.exon12.rev,	AGCCCCTCTTGGCTTGAGTA, TGCCGATTCCCTCCATTCT,	298	57
13	myh.exon13.fwd, myh.exon13.rev,	AGGGCAGTGGCATGAGTAAC, GGCTATTCCGCTGCTCACTT,	242	57
14	myh.exon14.fwd, myh.exon14.rev,	TTGGCTTTTGAGGCTATATCC, CATGTAGGAAACACAAGGAAGTA,	256	54

15	myh.exon15.fwd, myh.exon15.rev,	TGAAGTTAAGGGCAGAACACC, G TTCACCCAGACATTCGTTAGT,	205	54
16	myh.exon16.fwd, myh.exon16.rev,	AGGACAAGGAGAGGATTCTCTG, GGAATGGGGGCTTTCAGA,	224	54

Tableau IV: Amorces du gène *hOGG1*

E	Nom de l'amorce	Séquence (5'-3')	pb	T (°C)
1	hOGG1.exon1.foward, hOGG1.exon1.reverse,	CTTTGGGCGTCGACGAG, GAGGGGACAGGCTTCTCAG,	237	57
2	hOGG1.exon2.foward1, hOGG1.exon2.reverse1, hOGG1.exon2.foward2, hOGG1.exon2.reverse2,	ATTGAGTGCCAGGGTTGTCA, CGGAACCCCAGTGGTGATAC, TGTACTAGCGGATCAAGTAT, TGGCAAAACTGAGTCATAG,	245 286	57 50
3	hOGG1.exon3.foward1, hOGG1.exon3.reverse1, hOGG1.exon3.foward2, hOGG1.exon3.reverse2,	GTCTGGTGTTGCTTTCTCTAAC, GTGATGCGGGCGATGTT, TCTCCAGGTGTGCGACTGC, AGGAAGCCTTGAGAAGGTAACC ,	229 275	50 57
4	hOGG1.exon4.foward, hOGG1.exon4.reverse,	GGAAGAACTTGAAGATGCCT, GCTCATTTCTGCTCTCC,	296	55
5	hOGG1.exon5.foward hOGG1.exon5.reverse,	CCGGCTTTGGGGCTATA, GTTTCTACCATCCCAGCCCA,	279	57
6	hOGG1.exon6.forward, hOGG1.exon6.reverse,	TACTTCTGTTGATGGGTCAC, TGGAGGAGAGGAAACCTAG,	153	55
7	hOGG1.exon7.forward, hOGG1.exon7.reverse,	ACCTCCCAACACTGTCACTA, CCCTCCCCAACATGAGA,	265	55
8	hOGG1.exon8.foward1, hOGG1.exon8.reverse1, hOGG1.exon8.foward2, hOGG1.exon8.reverse2,	CTGTGGCCCACGCACTTGTG, ACGTCCTTGGTCCAGCAGTGGT, GAGAGGGGATTCAACAAGGTG, GCCATTAGCTCCAGGCTTAC,	253 287	57 55

Tableau V: Amorces du gène *hMTH*

E	Nom de l'amorce	Séquence (5'-3')	bp	T (°C)
2	hMTH.exon2.foward, hMTH.exon2.reverse,	GCAAGGACAGAGGGCTTTCTG, CCAGCAGGCCATCAACTGAT,	24 9	67
3	hMTH.exon3.foward, hMTH.exon3.reverse,	GCACGTCATGGCTGACTCT, CTGGGAAAGCCGGTTCTAT,	24 6	57
4	hMTH.exon4.foward, hMTH.exon4.reverse,	TCCCTGGGCTGTGTGTAGAT, GAGATGGGACCCGCATAGT,	29 8	57
5	hMTH.exon5.foward, hMTH.exon5.reverse,	TGAAGTTTGGGTTGCACCTC, AGATGGTTTGCGGCTGTTC,	28 1	57

Tableau VI : Conditions de PCR pour un volume total de 25 μ L

	Conc. départ	Conc. fin	Vol. /tube (μ L)
Tampon	10 x	1 x	2.5
MgCl ₂	50 mM	1.5 mM	0.75
dNTP	10 mM	0.2 mM	0.5
Amorce forward	5 μ M	0.2 μ M	1
Amorce reverse	5 μ M	0.2 μ M	1
Taq Platinum	5 U	1 U	0.2
ADN génomique	5 ng/ μ L	15 ng	3
H ₂ O			25- (total)

Tableau VII: Protocole pour l'amplification de l'ADN génomique

Cycle	Température (°C)	Durée	Nombre de cycles
Dénaturation	94	10 min	1
Dénaturation	94	30 sec	
Appariement	Temp. Appariement spécifique aux amorces	30 sec	30 à 35
	72		
Élongation		30 sec	
Élongation	72	7 min	1
Fin	4	-	-

ANNEXE II

Séquence obtenue par séquençage automatique d'un adénome du patient 1:

Forward: >1+cat2F.A04_06052509CT sequence exported from
1+cat2F.A04_06052509CT.ab1

GGGGGACAAGTNGTAACAGACAGAAAAGCGGCTGTTAGTCACTGGCAGT
CAACAGTCTTACCTGGACTCTGGAATCCATTCTGGTGCCACTACCACAGC
TCCTTCTCTGAGTGGTAAAGGCAATCCTGAGGAAGAGGATGTGGATACCT
CCCAAGTCCTGTATGAGTGGGAACAGGGATTTTCTCAGTCCTTCACTCAA
GAACAAGTAGCTGG

Reverse: >1+cat2rev.A09_060615103U sequence exported from
1+cat2rev.A09_060615103U.ab1

TTCCCACTCATACAGGACTTGGTGAGGTATCCACATCCTCTTCCTCAGGAT
TGCTTTTACCACTCAGAGAAGGAGCTGTGGTAGTGGCACCAGAATGGATT
CCAGAGTCCAGGTAAGACTGTTGCTGCCAGTGAATAACAGCCGCTTTTCT
GTCTGGTTCCATGGCCATGTCCAACCTCCATCAAAATAA

Séquence obtenue par séquençage automatique d'un adénome du patient 2:

Forward: >3+cat2F.C04_06052509CQ sequence exported from
3+cat2F.C04_06052509CQ.ab1

AGTNGTAACAGACAGAAAAGCGGCTGTTAGTCACTGGCAGTCAACAGTC
TTACCTGGACTCTGGAATCCATTCTGGTGCCACTACCACAGCTCCTTCTCT
GAGTGGTAAAGGCAATCCTGAGGAAGAGGATGTGGATACCTCCCAAGTC
CTGTATGAGTGGGAACAGGGATTTTCTCAGTCCTTCACTCAAGAACAAGT
AGCTGGA

Reverse: >3+cat2rev.C09_060615103R sequence exported from
3+cat2rev.C09_060615103R.ab1

TTCCCACTCATACAGGACTTGGTGAGGTATCCACATCCTCTTCCTCAGGAT
TGCTTTTACCACTCAGAGAAGGAGCTGTGGTAGTGGCACCAGAATGGATT
CCAGAGTCCAGGTAAGACTGTTGCTGCCAGTGAATAACAGCCGCTTTTCT
GTCTGGTTCCATGGCCATGTCCAACCTCCATCAAAATATA

Séquence obtenue par séquençage automatique d'ADN génomique d'un contrôle négatif:

Forward: >5+cat2F.E04_06052509CN sequence exported from
5+cat2F.E04_06052509CN.ab1

GCANGTNGTAACCAGACAGAAAAGCGGCTGTTAGTCACTGGCAGCAACA
GTCTTACCTGGACTCTGGAATCCATTCTGGTGCCACTACCACAGCTCCTTC
TCTGAGTGGTAAAGGCAATCCTGAGGAAGAGGATGTGGATACCTCCCAA
GTCCTGTATGAGTGGGAACAGGGATTTTCTCAGTCCTTCACTCAAGAACA
AGTAGCTGG

Reverse: >5+cat2rev.E09_060615103N sequence exported from

5+cat2rev.E09_060615103N.ab1

CCACTCATACAGGACTTGGGAGGTATCCACATCCTCTTCCTCAGGATTGC
CTTTACCACTCAGAGAAGGAGCTGTGGTAGTGGCACCAGAATGGATTCCA
GAGTCCAGGTAAGACTGTTGCTGCCAGTGAATAACAGCCGCTTTTCTGTC
TGGTTCCATGGCCATGTCCAACCTCCATCAAAATACAA

L'absence de mutation somatique dans le gène CTNNB1 a été confirmée par BLAST avec les séquences suivantes :

Séquence référence CTNNB1 de Ensembl: ENSE00001119569

CTGATTTGATGGAGTTGGACATGGCCATGGAACCAGACAGAAAAGCGGC
TGTTAGTCACTGGCAGCAACAGTCTTACCTGGACTCTGGAATCCATTCTG
GTGCCACTACCACAGCTCCTTCTCTGAGTGGTAAAGGCAATCCTGAGGAA
GAGGATGTGGATACCTCCCAAGTCCTGTATGAGTGGGAACAGGGATTTTC
TCAGTCCTTCACTCAAGAACAAGTAGCTG

Séquence référence CTNNB1 de UCSC : NM_001904

CTGATTTGATGGAGTTGGACATGGCCATGGAACCAGACAGAAAAGCGGC
TGTTAGTCACTGGCAGCAACAGTCTTACCTGGACTCTGGAATCCATTCTG
GTGCCACTACCACAGCTCCTTCTCTGAGTGGTAAAGGCAATCCTGAGGAA
GAGGATGTGGATACCTCCCAAGTCCTGTATGAGTGGGAACAGGGATTTTC
TCAGTCCTTCACTCAAGAACAAGTAGCTG

Les séquences ont aussi été alignées par BLAST entre elles (forward et reverse) et entre les patients (patient 1 et patient 2) et avec la séquence contrôle (patient 1 et séquence contrôle, patient 2 et séquence contrôle). Aucune mutation n'a été retrouvée.

ANNEXE III

Figure 19 : *Microdissection au laser des adénomes colorectaux chez les patients I et II.*

Avant microdissection
Sélection des cellules

Capture des cellules

Après microdissection
Cellulmicrodissecquées

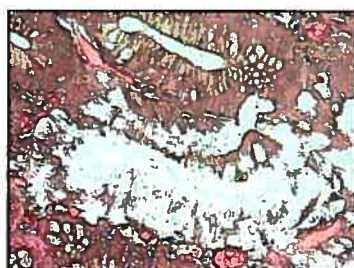
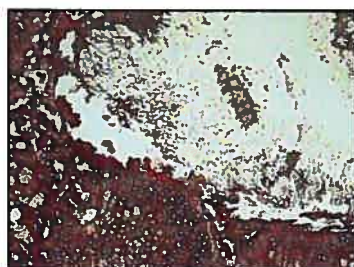
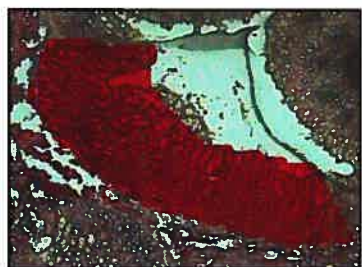
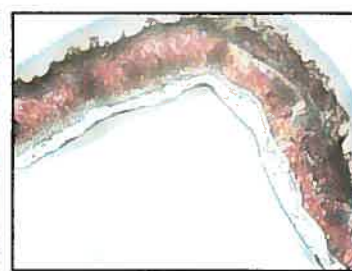
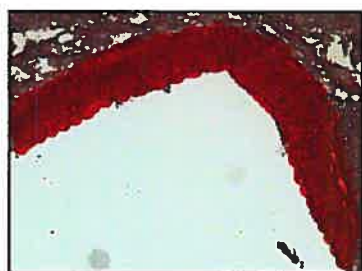


Tableau VIII : *Conditions de PCR pour la microdissection dans un volume total de 25 uL*

	Conc. départ	Conc. fin	Vol. /tube (uL)
Tampon	10 x	1 x	2.5
MgCl ₂	50 mM	1.5 mM	0.75
dNTP	10 mM	0.2 mM	0.5
Amorce forward	5 µM	0.2 µM	1
Amorce reverse	5 µM	0.2 µM	1
Taq Platinum	5 U	1 U	0.2
ADN génomique		*	5
H ₂ O			25- (total)

*Prendre 5 uL des cellules capturées par microdissection

Tableau IX: *Protocole pour l'amplification de l'ADN provenant des cellules capturées*

Cycle	Température (°C)	Durée	Nombre de cycles
Dénaturation	94	10 min	1
Dénaturation	94	30 sec	
Appariement	Temp. Appariement spécifique aux amorces	30 sec	35 à 40
Élongation	72	30 sec	
Élongation	72	7 min	1
Fin	4	-	-

ANNEXE IV

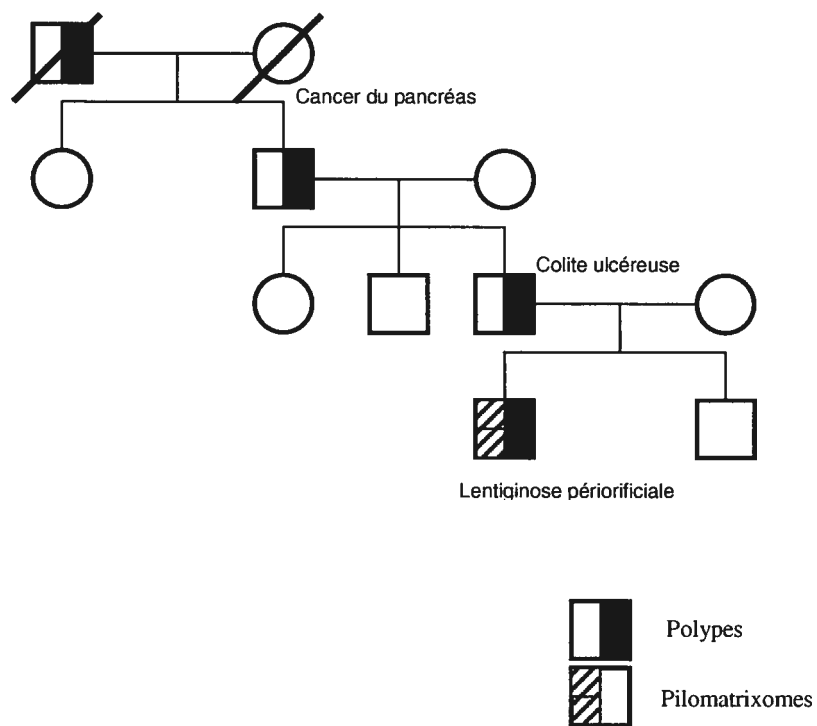


Figure 20 : *Arbre généalogique de la famille du patient I. La famille de ce patient est actuellement en cours d'investigation.*

